

Rolle des Hepatoadipokins Chemerin in der Entstehung von Insulinresistenz, Dyslipidämie und Atherosklerose im Mausmodell

Dissertation

Zum Erwerb des Doktorgrades der Humanbiologie

An der Medizinischen Fakultät der

Ludwig-Maximilians-Universität zu München

Vorgelegt von

Melanie Becker

Aus Heidelberg

2012

Aus der Medizinischen Klinik II des Klinikums Großhadern
der Ludwig-Maximilians-Universität
Direktor Prof. Dr. Burkhard Göke

**Rolle des Hepatoadipokins Chemerin
in der Entstehung von
Insulinresistenz, Dyslipidämie und Atherosklerose im
Mausmodell**

Dissertation

Zum Erwerb des Doktorgrades der Humanbiologie
An der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

Vorgelegt von
Melanie Becker
Aus Heidelberg
2012

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter:	PD Dr. med. Uli C. Brödl
Mitberichterstatter:	Prof. Dr. Jochen Seißler Priv. Doz. Dr. Regina Fluhrer
Mitbetreuung durch die promovierten Mitarbeiter:	PD Dr. med. M. Lehrke Prof. Dr. med K.G. Parhofer
Dekan:	Prof. Dr. med. Dr. h.c. M. Reiser, FACR, FRCR
Tag der mündlichen Prüfung:	13.02.2013

**So eine Arbeit wird eigentlich nie fertig,
man muss sie für fertig erklären,
wenn man nach der Zeit und den Umständen
das Möglichste getan hat.**

Johann Wolfgang von Goethe, Italienische Reise 1787

Inhalt

Abbildungsverzeichnis.....	8
Tabellenverzeichnis	11
Abkürzungsverzeichnis	12
1 Zusammenfassung	16
2 Einleitung.....	17
2.1 Das Metabolische Syndrom	17
2.1.1 Einleitung und Definition	17
2.1.2 Epidemiologie des MetS.....	19
2.1.3 Komponenten des Metabolischen Syndroms	19
2.1.3.1 Adipositas	19
2.1.3.2 Hypertonie.....	21
2.1.3.3 Dyslipoproteinämie	22
2.1.3.4 Glukoseintoleranz, Insulinresistenz und Diabetes Mellitus	23
2.2 Der Insulinsignalweg	26
2.2.1 Insulin	26
2.2.2 Der Insulinrezeptor und Insulinsignalweg	26
2.2.2.1 Der PI3K-Signalweg.....	26
2.2.2.2 AMPK α und Insulinsignalweg	28
2.3 Zytokine	30
2.3.1.1 Adipokine	30
2.3.2 Chemerin	31
2.3.3 Entdeckung von Chemerin	31
2.3.4 Struktur und Prozessierung von Chemerin	31
2.3.5 Physiologische Rolle von Chemerin.....	33
2.3.5.1 Chemerin und Immunsystem	33
2.3.5.2 Chemerin und Adipositas	35
2.3.5.3 Chemerin und Glukosehomöostase	36
2.4 Adeno-assoziierte Viren.....	38
2.4.1 Allgemein	38
2.4.2 AAV2.8.....	38
2.4.3 Struktur	39
2.4.3.1 Inverted terminal repeats (ITRs).....	39
2.4.3.2 Rep-Gene und Rep-Proteine.....	39
2.4.3.3 Cap-Gene und VP-Proteine.....	40
2.4.4 Infektionszyklus.....	41
2.4.5 AAVs in der Gentherapie	41
2.5 Fragestellung und Ziel der Arbeit	43
3 Material und Methoden	45

3.1	Verbrauchsmaterialien und verwendete Kits	45
3.2	Geräte	48
3.3	Molekularbiologische Methoden.....	49
3.3.1	Erstellen von cDNA-Bibliotheken	49
3.3.1.1	RNA-Isolation aus Zellen.....	49
3.3.1.2	RNA-Isolation aus Gewebe	49
3.3.1.3	DNase-Verdau	49
3.3.1.3.1	Reverse Transkription-PCR (RT-PCR)	50
3.3.2	RNA und DNA Quantifizierung	51
3.3.3	PCR-Methoden	51
3.3.3.1	PCR Amplifikation von DNA	51
3.3.3.2	Library PCR	52
3.3.3.3	Koloniescreening PCR	53
3.3.3.4	Quantitative Real Time-PCR (qRT-PCR)	54
3.3.3.4.1	Virusquantifizierung.....	56
3.3.3.4.2	Genexpression.....	57
3.4	DNA Sequenzierung	58
3.5	Agarose-Gelelektrophorese	58
3.5.1	Reinigung von DNA aus Agarosegelen	59
3.5.2	Reinigung von DNA nach „enzymatischen Reaktionen“	59
3.6	Klonierung von Chemerin	59
3.6.1	Restriktionsverdau	59
3.6.2	Klonierung von Chemerin.....	60
3.6.3	Ligation.....	61
3.7	Mikrobiologische Methoden	61
3.7.1	Transformation kompetenter E.coli	61
3.7.1.1	Transformation DH5 α	61
3.7.1.2	Transformation Stb12.....	61
3.7.2	Plasmidpräparation aus E.coli	62
3.8	Proteinchemische Methoden	62
3.8.1	Immunoblotting	62
3.8.2	Proteinpräparation aus Geweben	62
3.8.3	Proteinmengenbestimmung nach Bradford.....	63
3.8.4	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese	63
3.8.4.1	Detektion.....	65
3.8.4.2	Stripping	66
3.8.5	ELISA.....	66
3.8.5.1	Sandwich ELISA.....	66
3.9	Zellbiologische Methoden	67
3.9.1	Zellkultur	67

3.9.1.1	Zelllinie	67
3.9.1.2	Kultivierung	68
3.9.1.3	Passagieren der HEK-293T Zellen	68
3.9.2	Produktion der AAVs	68
3.9.2.1	Transfektion von HEK-293T Zellen mit Polyethylenimid (PEI)	68
3.9.2.1.1	Virusaufreinigung mit Cäsiumchloridgradient	69
3.10	<i>In vivo</i> Studien	71
3.10.1	Tierstudien	71
3.10.1.1	Versuchsablauf C57BL/6 Wildtypmäuse	71
3.10.1.2	Versuchsablauf LDLR-KO Mäusen	72
3.10.2	Intra peritonealer Glukosetoleranztest (ipGTT)	72
3.10.3	Intra peritonealer Insulintoleranztest (ipITT)	72
3.11	Histologische Methoden	73
3.11.1	LacZ-Färbung von Gefrierschnitten	73
3.11.2	Aortenfärbung und Quantifizierung	74
4	Ergebnisse	75
4.1	Effekte von humanem Chemerin auf die Regulation von Glukose- und Lipidstoffwechsel in C57BL/6 Mäusen	75
4.1.1	Nachweis der AAV-vermittelten humanen Chemerin Expression in C57BL/6 Mäusen	77
4.1.1.1	Nachweis der Chemerin mRNA-Expression in C57BL/6 Mäusen	77
4.1.1.2	Nachweis von Chemerin im Serum von C57BL/6 Mäusen	78
4.1.2	Effekt von Chemerin auf das Körpergewicht von C57BL/6 Mäusen	80
4.1.3	Effekt von Chemerin auf den Glukosestoffwechsel von C57BL/6 Mäusen	81
4.1.4	Effekt von Chemerin auf die Serumlipide in C57BL/6 Mäusen	83
4.2	Effekte von humanem Chemerin auf die Regulation von Glukose- und Lipidstoffwechsel in LDLR-KO Mäusen	85
4.2.1	Nachweis der AAV-vermittelten humanen Chemerin Expression in LDLR-KO Mäusen	87
4.2.1.1	Nachweis der Chemerin mRNA-Expression in LDLR-KO Mäusen	87
4.2.1.2	Nachweis von Chemerin im Serum von LDLR-KO Mäusen	87
4.2.2	Effekt von Chemerin auf das Körpergewicht von LDLR-KO Mäusen	90
4.2.3	Effekt von Chemerin auf den Glukosestoffwechsel von LDLR-KO Mäusen	91
4.2.4	Effekt von Chemerin auf die Serumlipide in LDLR-KO Mäusen	95
4.2.5	Effekt von Chemerin auf Atherosklerose in LDLR-KO Mäusen	96
5	Diskussion	98
6	Literaturverzeichnis	107
7	Danksagung	118
8	Lebenslauf	119
9	Erklärung	121

Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 2-1: Schematische Darstellung des PI3K/Akt-Signalwegs. Insulin (INS) bindet an den Insulinrezeptor (INSR). An den phosphorylierten INSR bindet Phosphoinositol-3-Kinase (PI3K) und aktiviert Phosphatidylinositol (3, 4, 5) bisphosphate (PIP₃). Im Folgenden wird durch PIP₃ die Protein kinase 3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1 (PDK1) aktiviert, die ihrerseits Akt1 phosphoryliert. Akt1 inhibiert Glykogensynthasekinase 3 beta (GSK3B) und Transkriptionsfaktoren der FoxO Familie. (verändert nach: ariadnegenomics.com) 27
- Abbildung 2-2: Schematische Darstellung der Rolle von AMPK im Glukosetransport. Stimuli, die eine Erhöhung des AMP/ATP-Verhältnisses auslösen, aktivieren AMPK und induzieren so den Glukosetransport. Hypoxie induzierter Glukosetransport scheint ausschließlich AMPK vermittelt zu sein, während durch Bewegung und osmotischen Stress vermittelte Glukoseaufnahme gleichzeitig durch andere Signalwege induziert werden. Metformin und Thiazolidinedione, aktivieren ebenfalls AMPK. Die potentielle Rolle von AMPK bei der Erhöhung der Insulinsensitivität ist bisher wenig verstanden. →Stehen für bekannte Verknüpfungen zwischen Stimuli, Signalen und Glukosetransport; ---> Stehen für mögliche Interaktionen. (aus Fuji et al., 2006 [82]). 29
- Abbildung 2-3: Proteolytische Prozessierung von Chemerin. Chemerin wird als Prä-Prochemerin (AS 1-163) synthetisiert. Die Sekretion des inaktiven Vorläuferproteins, Prochemerin (AS 20-163), erfordert eine N-terminale Prozessierung. Extrazelluläre Proteolyse des C-Terminus wandelt das Prochemerin in biologisch aktives Chemerin um. Cathepsin G spaltet 7 C-terminale AS des Chemerin ab (Chemerin-156); Elastase spaltet 6 AS (Chemerin-157), 8 AS (Chemerin-155) oder 11 AS (Chemerin-152) ab; Plasmin spaltet 5 AS (Chemerin-158) ab und Tryptase spaltet 5 AS (Chemerin-158) oder 8 AS (Chemerin-155) ab. Mehrere Prozessierungsschritte können nötig sein, um Chemerin vollständig zu aktivieren. Initial mit Spaltung durch Tryptase, was in einem Chemerin mit geringer biologischer Aktivität resultiert (Chemerin-158), gefolgt von einer zweiten Spaltung durch die Carboxypeptidase N oder B, was in dem vollständig aktivierten Chemerin (Chemerin-157) resultiert. Die Aktivierung von Chemerin-156 und -157 wird durch Spaltung durch Chymase zu Chemerin-154 (inaktives Chemerin) beendet. Chemerin-157 kann auch durch Spaltung von ACE zu Chmerin-155 inaktiviert werden. Die Nummer z. B. -155 steht für die terminale Aminosäureposition des prozessierten Proteins. . → Stehen für Aktivierung; ---> Stehen für Inaktivierung. (aus Ernst et al., 2010 [110]). 33
- Abbildung 2-4: Schematische Darstellung des AAV-Genoms. Gestreifte Boxen: ITRs; Pfeile markieren den Transkriptionsstartpunkt der Operone; weiße Boxen stehen für die codierenden Regionen. Der linke Open reading frame (ORF) codiert für die Rep-Gene Rep78, Rep 68, Rep 52 und Rep40. Der linke ORF codiert für die Cap-Gene VP1, VP2 und VP3. (aus Rolling et al., 1995 [181]). 40
- Abbildung 3-1 Lac-Z Färbung eines Leber-Gefrierschnitts. Die blau gefärbten Zellen zeigen AAV infizierte Zellen, die das LacZ-Transgen exprimieren. 74
- Abbildung 4-1: Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus für C57BL/6 Mäuse. 76
- Abbildung 4-2: mRNA-Expression von humanem Chemerin (Chemerin) in C57BL/6 Mäusen injiziert mit 1×10^{13} AAV.LacZ-oder AAV.Chemerin-Partikeln (n=7/Gruppe). Leber (a), gonadales Fettgewebe (b). Expression von

mChemerin mRNA in der Leber von (c) C57BL/6 Mäusen injiziert mit 1×10^{13} AAV.LacZ- oder AAV.Chemerin-Partikeln (n=7/Gruppe). **p≤0,01.....	77
Abbildung 4-3: Western-Blot-Analyse der humanen Chemerinexpression im Serum von 3 repräsentativen C57BL/6 Mäusen, injiziert mit 1×10^{13} Partikeln AAV.LacZ oder AAV.Chemerin. Kontroll-Serum eines gesunden Probanden.	78
Abbildung 4-4: Konzentration von Chemerin (ng/ml) im Serum 4 Wochen (a), 16 Wochen (b) und 21 Wochen nach der Injektion von C57BL/6 Mäusen mit 1×10^{13} Partikeln AAV.LacZ- oder AAV.Chemerin (n=7/Gruppe). Als Referenz wurde Serum von gesunden Probanden (n=3) verwendet.	79
Abbildung 4-5: Expression von mChemerin im Serum von C57BL/6 Mäusen im Alter von 4-5 Wochen (n=5/Gruppe) vor Virusinjektion (a) und 4 Wochen nach Injektion mit 1×10^{13} Partikeln AAV.LacZ oder AAV.Chemerin (b)..	80
Abbildung 4-6: Gewichtsverlauf C57BL/6 Mäuse injiziert mit 1×10^{13} Partikeln AAV.LacZ-(schwarze Quadrate) oder AAV.Chemerin-(weiße Dreiecke) (n=7/Gruppe) über 21 Wochen. Woche 1-8: ND; Woche 9-21 HFD.....	80
Abbildung 4-7: Effekt von Chemerin auf Glukose- (a) und Insulinspiegel (b) während des ipGTTs in C57BL/6 Mäusen nach 10 Wochen auf HFD und 20 Wochen nach der Injektion mit 1×10^{13} Partikeln AAV.LacZ (schwarz) oder AAV.Chemerin (weiß) (n=7/Gruppe).	81
Abbildung 4-8: Effekt von Chemerin auf die Insulin stimulierte Akt1 Phosphorylierung und AMPKα Phosphorylierung in Leber (a, b), Skelettmuskulatur (c, d) und gonadalem Fettgewebe (e, f) von 3 repräsentativen C57BL/6 Mäusen/Gruppe injiziert mit 1×10^{13} Partikeln AAV.LacZ oder AAV.Chemerin (Daten repräsentativ für n=4/Gruppe).	82
Abbildung 4-9: mRNA Expression von Glucose-6-Phosphatase (G6P) (a) und Phosphoenolpyruvat-Carboxynase (PEPCK) (b) in der Leber von C57BL/6 Mäusen injiziert mit 1×10^{13} Partikeln AAV.LacZ oder AAV.Chemerin (n=7/Gruppe).	83
Abbildung 4-10: Messung der Serumlipide in C57BL/6 Mäusen injiziert mit 1×10^{13} Partikeln AAV.LacZ (schwarz) oder AAV.Chemerin (weiß) (n=7/Gruppe) über 20 Wochen unter ND und HFD. Gesamtcholesterin (a), HDL-C=HDL-Cholesterin; non-HDL-C=non-HDL-Cholesterin (c), TG=Triglyceride (d). *p<0,05; **p≤0,01	84
Abbildung 4-11: Schematische Darstellung des Versuchsablaufs in LDLR-KO Mäusen	86
Abbildung 4-12: mRNA-Expression von Chemerin in LDLR-KO Mäusen injiziert mit 1×10^{13} Partikeln AAV.LacZ oder AAV.Chemerin (n=12/Gruppe). Leber (a), gonadales Fettgewebe (b), Skelettmuskulatur (c) und Carotiden (d). Expression von mChemerin mRNA in der Leber (e) von LDLR-KO Mäusen injiziert mit 1×10^{13} Partikeln AAV.LacZ oder AAV.Chemerin (n=12/Gruppe). *p<0,05; **p≤0,01	88
Abbildung 4-13: Western-Blot-Analyse der humanen Chemerinexpression im Serum von 3 repräsentativen LDLR-KO Mäusen, injiziert mit 1×10^{13} Partikeln AAV.LacZ oder AAV.Chemerin. Kontroll-Serum eines gesunden Probanden.	88
Abbildung 4-14: Konzentration von humanem Chemerin (ng/ml) im Serum 4 Wochen (a), 12 Wochen (b) und 16 Wochen (c) nach der Injektion von LDLR-KO Mäusen mit 1×10^{13} Partikeln AAV.LacZ- oder AAV.Chemerin (n=12/Gruppe). Als Referenz wurde Serum von gesunden Probanden (n=3) verwendet.	89

Abbildung 4-15: Konzentration von mChemerin im Serum von LDLR-KO Mäusen im Alter von 4-5 Wochen (n=5/Gruppe) vor Virusinjektion (a) und 16 Wochen (b) nach Injektion mit 1×10^{13} Partikeln AAV.LacZ oder AAV.Chemerin.	90
Abbildung 4-16: Gewichtsverlauf LDLR-KO Mäuse injiziert mit 1×10^{13} Partikeln AAV.LacZ (schwarze Quadrate) oder AAV.Chemerin (weiße Dreiecke) (n=12/Gruppe) über 16 Wochen unter HFD. * $p < 0,05$	91
Abbildung 4-17: Effekt von Chemerin auf Glukose-(a) und Insulinspiegel (b) während des ipGTTs in LDLRKO Mäusen 12 Wochen auf HFD nach der Injektion mit 1×10^{13} Partikeln AAV.LacZ (schwarze Vierecke) oder AAV.Chemerin (weiße Dreiecke) (n=10/Gruppe). * $p < 0,05$	92
Abbildung 4-18: Effekt von Chemerin auf Glukose während des ipITTs in LDLR-KO Mäusen 13 Wochen auf HFD nach der Injektion mit 1×10^{13} Partikeln AAV.LacZ (schwarze Vierecke) oder AAV.Chemerin (weiße Dreiecke) (n=10/Gruppe). * $p < 0,05$; ** $p \leq 0,01$	92
Abbildung 4-19: Effekt von Chemerin auf die basale und Insulin stimulierte Akt1 Phosphorylierung (a, b) und AMPK α Phosphorylierung (c, d) in der Leber von drei repräsentativen LDLRKO Mäusen/Gruppe injiziert mit 1×10^{13} Partikeln AAV.LacZ oder AAV.Chemerin (Daten repräsentativ für n=6/Gruppe).	93
Abbildung 4-20: mRNA Expression von G6P (a) und PEPCK (b) in der Leber von LDLR-KO Mäusen injiziert mit 1×10^{13} Partikeln AAV.LacZ oder AAV.Chemerin (n=12/Gruppe)	94
Abbildung 4-21: Effekt von Chemerin auf die basale und Insulin stimulierte Akt1 Phosphorylierung (a, b) und AMPK α Phosphorylierung (c, d) im gonadalen Fettgewebe von drei repräsentativen LDLRKO Mäusen/Gruppe injiziert mit 1×10^{13} Partikeln AAV.LacZ oder AAV.Chemerin (Daten repräsentativ für n=6/Gruppe).	94
Abbildung 4-22: Effekt von Chemerin auf die basale und Insulin stimulierte Akt1 Phosphorylierung (a, b) und AMPK α Phosphorylierung (c, d) im Skelettmuskel von drei repräsentativen LDLRKO Mäusen/Gruppe injiziert mit 1×10^{13} Partikeln AAV.LacZ oder AAV.Chemerin (Daten repräsentativ für n=6/Gruppe).	95
Abbildung 4-23: Messung der Serumlipide in LDLR-KO Mäusen injiziert mit 1×10^{13} Partikeln AAV.LacZ (schwarz) oder AAV.Chemerin (weiß) (n=12/Gruppe) über 16 Wochen unter HFD. Gesamtcholesterin (a), HDL-C=HDL-Cholesterin; non-HDL-C=non-HDL-Cholesterin (c), TG=Triglyceride (d). ** $p \leq 0,01$	96
Abbildung 4-24: Effekt von Chemerin auf den atherosklerotischen Plaqueanteil, ermittelt durch <i>en face</i> Quantifizierung der gesamten Aorta von LDLRKO Mäusen auf HFD injiziert mit 1×10^{13} Partikeln AAV.LacZ (n=11) oder AAV.Chemerin (n=12). Bilder der Oil-Red-O gefärbten Gesamtaorta (a) und prozentualer Anteil der atherosklerotischen Plaquefläche/Gesamtaorta (b).	97

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Vergleich der Definitionen des MetS nach WHO (1999) [7], NECP ATP III (2001) [8] und IDF (2004) [9]	
Richtlinien.....	18
Tabelle 2: Definition des MetS.....	19
Tabelle 3: Verwendete PCR-Primer.....	51
Tabelle 4: Primer und Sonden für qRT-PCR.....	55
Tabelle 5: Genexpression-Assays	56
Tabelle 6: Verwendete Antikörper für Western-Blot-Analyse	65

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µM	Mikromolar
AAV	Adeno assoziierter Vektor
AMPK	AMP-activated protein kinase
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
BMI	Body-Mass-Index
bp	Basenpaar
BSA	Bovine serum albumin
cap	Capsid
cDNA	Complementary-Desoxyribonukleinsäure
cfu	Colony forming unit
Cl	Chlor
cm	Zentimeter
CMKLR1	Chemokine like receptor 1
CRP	C-reaktives Protein
CsCl	Cäsiumchlorid
CVD	Cardio vascular disease
db/db	diabetic/diabetic
DEPC	Diethylpyrocarbonate
dl	Deziliter
DM	Diabetes mellitus
DMEM	Dubelcco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DOC	Desoxycholsäure
ds	Doppelsträngig
DTT	Dithiotreithol
E	Extinktion
E.coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamine tetraacetic acid
ELISA	Enzyme linked immunosorbent assay
FAM	6-carboxyfluorescein
FBS	Fetal bovine serum

FFS	Freie Fettsäure
FS	Fettsäure
g	Gramm
G6P	Glukose-6-Phosphatase
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GLUT4	Glukosetransporter 4
GSK3	Glycogen synthase kinase 3
h	Stunde
HDL-C	High-density lipoprotein cholesterol
HFD	Hochfettdiät
HRP	Horsereddishperoxidase
I.E.	Internationale Einheit
IDF	International Diabetes Federation
IL	Interleukin
ipGTT	Intra peritonealer Glukosetoleranztest
ipITT	Intra peritonealer Insulintoleranztest
IRS-1	Insulin receptor substrate 1
ITR	Inverted terminal repeat
kbp	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
KFe(CN) ₆	Kaliumhexacyanoferrat
KHK	Koronare Herzkrankheit
KO	Knock out
l	Liter
LB	Luri bertani
LDL	Low-density lipoprotein
LDLR-KO	Low-density-lipoprotein receptor knock out
LPS	Lipopolysaccharid
M	Mol
mA	Milliampere
MetS	Metabolisches Syndrom
mg	Milligramm
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
min	Minute
Mio	Million
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mmol	Millimol

mM	Millimolar
mRNA	Messenger Ribonukleinsäure
N	Normalität
n	Anzahl
NA	Natrium
Na ₃ VOP ₄	Natriumorthovandat
NaF	Natriumfluorid
Na-Hep	Natrium-Heparin
NCEP ATP III	National Cholesterol Education Program Adult Treatment Panel III
ND	Normaldiät
ng	Nanogramm
NK	Natürliche Killerzellen
nm	Nanometer
ns	Nicht signifikant
ob/ob	obese/obese
p	Phosphoryliert
p	Wahrscheinlichkeit
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	Polymerase chain reaction
PEI	Polyethylenimin
Pen	Penicillin
PEPCK	Phosphoenolpyruvate carboxykinase
PFA	Paraformaldehyd
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
PIP ₃	Phosphatidyl-3,4,5-Trisphosphat
pmol	Pikomolar
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PVDF	Polyvinylidene difluoride
qRT-PCR	Quantitative Reverse-Transkriptase PCR
rep	Replication
RI	Refraktionsindex
rpm	Rounds per minute
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse-transcriptase polymerase chain reaction
SDS	Sodiumdodecylsulfat
sec	Sekunde
ss	Single stranded

Strep	Streptomycin
T2DM	Typ 2 Diabetes mellitus
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TAMRA	5-carboxytetramethylrhodamine
TBG	Thyroxin binding globulin
TBST	Tris-Buffered Saline und Tween 20
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TG	Triglyceride
TNF	Tumor-Necrosis Factor
Tris	Tris-acetate-EDTA
U	Units
UV	Ultraviolett
V	Volt
VLDL	Very-low-density lipoproteins
WHO	World Health Organization
WHR	Waist to Hip Ratio

1 Zusammenfassung

Das Metabolische Syndrom beschreibt das gemeinsame Auftreten von Adipositas, Hypertonie, Dyslipoproteinämie und Diabetes Mellitus. In den vergangenen Jahrzehnten hat sich das Metabolische Syndrom zu einer Volkskrankheit besonders in den Industriestaaten entwickelt. Lebensstilveränderungen und die darauf basierende Entwicklung von Adipositas und anderer Syndromkomponenten spielen hierbei die Hauptrolle, denn Adipokine haben Einfluss auf metabolische Vorgänge im Körper. Ein relatives neues Hepatoadipokin ist in den letzten Jahren in den Fokus der Forschung gerückt: Chemerin. Chemerin zeigt *in vitro* und *in vivo* Effekte auf inflammatorische Vorgänge, Glukosemetabolismus und Lipidmetabolismus in verschiedenen Zelltypen und Geweben, wie Fettgewebe und Skelettmuskulatur. Beim Menschen ist Chemerin assoziiert mit den zentralen Komponenten des Metabolischen Syndroms, wie Body-Mass-Index, Triglyceride und HDL-Cholesterin.

Aufgrund der bisherigen Daten wurde in dieser Arbeit der Effekt von Chemerin auf Gewicht, den Glukose- und Lipidstoffwechsel und Atherosklerose *in vivo* in einem Tiermodell untersucht. Chemerin wurde mit Hilfe eines Adeno-assoziierten Vektorsystems in zwei komplementären Mausmodellen, C57BL/6 Wildtyp-Mäusen auf Normal- und Hochfettdiät sowie in LDLR-KO Mäusen auf Hochfettdiät exprimiert. Chemerin hatte keinen Effekt auf das Körpergewicht und Serumlipide von C57BL/6 und LDLR-KO Mäusen und zeigte keinen Effekt auf das Ausmaß der Atherosklerose in LDLR-KO. Einen Effekt von Chemerin konnte auf den Glukosemetabolismus festgestellt werden. Bei den Chemerin exprimierenden C57BL/6 Tieren ließen sich im *ip* Glukosetoleranztest tendenziell höhere Blutzuckerwerte verglichen mit den Kontrolltieren feststellen. In den LDLR-KO Tieren fanden sich im *ip* Glukosetoleranztest signifikant höhere Blutglukosewerte als bei den Kontrolltieren. In beiden Mausmodellen zeigte sich in der Chemerin exprimierenden Gruppe kein signifikanter Unterschied in der Insulinsekretion verglichen mit der Kontrollgruppe, so dass eine chronische Expression von Chemerin über einen langen Zeitraum in einem durch Hochfettdiät induzierten Mausmodell zu einer verschlechterten Glukosetoleranz führt, ohne die Insulinsekretion zu beeinflussen. Vielmehr liegt der pathologischen Glukosetoleranz eine Insulinresistenz durch eine verminderte Aktivierung der Insulin stimulierten Phosphorylierung von Akt1 und der AMPK- α Aktivierung in der Skelettmuskulatur der LDLRKO-Mäuse zugrunde.

Zusammenfassend konnten wir zeigen, dass die Expression von Chemerin eine pathologische Glukosetoleranz im Mausmodell durch eine Verschlechterung der Insulinsensitivität in der Skelettmuskulatur verursacht. Chemerin hat keinen Einfluss auf den Gewicht, Lipidstoffwechsel oder Atherosklerose im Mausmodell. Weitere Studien sind nötig um die genauen Mechanismen der Chemerinwirkung auf den Glukosestoffwechsel zu charakterisieren.

2 Einleitung

2.1 Das Metabolische Syndrom

2.1.1 Einleitung und Definition

Unter dem Begriff „Metabolisches Syndrom“ versteht man das gehäufte, gemeinsame Auftreten von abdominaler Adipositas (Fettsucht), Diabetes mellitus (DM) (mit Vorstufen Insulinresistenz, pathologische Nüchternglukose und gestörte Glukosetoleranz), atherogener Dyslipoproteinämie und arterieller Hypertonie (Bluthochdruck). Die Erkrankung hat in den vergangenen Jahrzehnten besonders in den sogenannten Wohlstandsgesellschaften der Industriestaaten, wie Europa und Nordamerika, in Folge einer Überernährung und mangelnder Bewegung, stark zugenommen.

Aber das „Konzept“ des Metabolisches Syndrom existiert mittlerweile seit mehr als 90 Jahren, seitdem Kylin in den 1920er Jahren den Zusammenhang zwischen Hypertonie, Hyperglykämie und Gicht beschrieben hat [1]. 1947 beschäftigte sich dann Vague mit den Phänotypen der Adipositas, die im allgemeinen mit metabolischen Auffälligkeiten wie Typ-2-Diabetes Mellitus (T2DM) und kardiovaskulären Erkrankungen (cardiovascular diseases = CVD), auftreten [2]. Der Ausdruck Metabolisches Syndrom (MetS) wurde dann schließlich von Hanefeld und Leonhard [3] in den 1980er Jahren geprägt. Sie fassten das MetS unter dem gemeinsamen Auftreten von abdominaler Adipositas, Hyper- und Dyslipoproteinämien, T2DM, Gicht und Hypertonie, verbunden mit erhöhter Inzidenz von arteriosklerotischen Gefäßerkrankungen, Fettleber und Cholelithiasis (Gallensteinleiden), die bei Überernährung und Bewegungsmangel auf der Grundlage einer genetischen Disposition auftritt, zusammen.

Das MetS ist auch unter dem Namen *Syndrom X* [4], Insulinresistenzsyndrom [5] und Tödliches Quartett [6] bekannt, der Begriff des MetS hat sich heute mehrheitlich in der Alltagssprache durchgesetzt.

In den letzten Jahrzehnten waren verschiedene Expertengruppen darum bemüht eine einheitliche Definition des MetS zu formulieren, um die klinischen Parameter klar zu definieren. Eine der ersten Definitionen stammt von der World Health Organization (WHO) [7]. Die WHO-Definition sieht die Insulinresistenz (mit den Vorstufen Glukoseintoleranz und/oder Insulinresistenz) als eine Hauptursache des MetS. Außerdem müssen zwei weitere Komponenten, wie Hypertonie, erhöhte Triglyceride (TG), vermindertes HDL-Cholesterol (HDL-C), Adipositas oder Mikroalbuminurie diagnostiziert werden, um von einem MetS sprechen zu können (Tabelle 1).

2001 brachte das National Cholesterol Education Program Third Adult-Treatment-Panel (NCEP ATP III) eine Definition mit Kriterien heraus, die im klinischen Alltag einfacher zu diagnostizieren

sind, als die Parameter der WHO, da zur Bestimmung der Glukoseintoleranz bzw. Insulinresistenz aufwendige Tests, wie ein oraler Glukosetoleranztest (GTT), von Nöten sind [8]. Die ATP III Richtlinien besagen, dass ein MetS vorliegt, wenn drei der fünf folgenden Kriterien erfüllt sind: abdominale Adipositas, erhöhte TG, erniedrigtes HDL-C, Hypertonie und eine erhöhte Nüchtern-Blutglukose (Tabelle 1).

Da weltweit unterschiedliche Definitionen für die Diagnose des MetS verwendet werden, hat sich die International Diabetes Federation (IDF) 2004 das Ziel gesetzt, eine weltweit einheitliche Definition des MetS zu geben [9], die im klinischen Alltag angewendet werden kann. Voraussetzung für das Vorhandensein MetS sieht die IDF das Vorliegen einer abdominalen Adipositas und zusätzliche zwei der weiteren Risikofaktoren: Insulinresistenz, Hypertonie und Dyslipoproteinämie (Tabelle 1). Die Tabelle 1 gibt einen Überblick über bisher bestehenden Definitionen des MetS und die diagnostischen Parameter.

Tabelle 1: Vergleich der Definitionen des MetS nach WHO (1999) [7], NECP ATP III (2001) [8] und IDF (2004) [9] Richtlinien.

	WHO (1999)	NECP ATP III (2001)	IDF (2004)
	Glukoseintoleranz, erhöhte Nüchternglukose oder Diabetes/ Insulinresistenz plus zwei der folgenden Kriterien:	Drei oder mehr der folgenden Kriterien:	Abdominale Adipositas plus (definiert über Taillenumfang) zwei der folgenden Kriterien:
Nüchtern-Blutglukose		≥ 5.6 mmol/l (100 mg/dl)	≥ 5.6 mmol/l (100 mg/dl) oder diagnostizierter Diabetes mellitus
Blutdruck	≥ 140/90 mmHg	≥ 130/≥ 85 mmHg	≥ 130/85 mmHg oder behandelte Hypertonie
TG	≥ 1.7 mmol/l (150 mg/dl) und/oder	≥ 1.7 mmol/l (150 mg/dl)	> 1.7 mmol/l (150 mg/dl) oder medikamentöse Behandlung
HDL-C	Männer: <0.9 mmol/l (35 mg/dl) Frauen: <1.0 mmol/l (40 mg/dl)	<1.03 mmol/l (40 mg/dl) <1.29 mmol/l (50 mg/dl)	<1.03 mmol/l (40 mg/dl) <1.29 mmol/l (50 mg/dl)
Adipositas	Männer: Taille-Hüfte-Verhältnis: > 0.9 Frauen: Taille-Hüfte-Verhältnis: > 0.85	Taillenumfang: > 102 cm Taillenumfang: > 88 cm	Taillenumfang: ≥ 94 cm Taillenumfang: ≥ 80 cm *
Mikroalbuminurie	Albuminexkretion im Urin ≥ 20 µg/min oder Albumin:Kreatinin Verhältnis ≥ 30 mg/g		

2009 hat sich eine Expertengruppe verschiedener Organisationen darum bemüht, eine weitere einheitliche Definition der klinischen Parameter zur Diagnose des MetS zu geben [10]. Das Problem der bestehenden Definitionen ist, dass bei der Bestimmung des Taillenumfangs keine Unterscheidung zwischen verschiedenen ethnischen Gruppen gemacht wurde. In der Definition der NECP ATP III liegen die Grenzwerte verglichen mit der IDF-Definition deutlich höher (Tabelle 1). In der 2009 herausgegebenen Definition wird bei der Diagnose des MetS der Taillenumfang populations- und länderspezifisch berücksichtigt [10]. So kann die Diagnose des MetS bei den verschiedenen Bevölkerungsgruppen gezielter gestellt werden. Drei von fünf der in Tabelle 2 aufgeführten Kriterien

müssen erfüllt sein, um von einem MetS sprechen zu können. Diese neue Definition zeigt, dass sich das Risiko für ein MetS mit einer differenzierteren Messung des Taillenumfangs in verschiedenen Populationen unterscheidet. Daher geht der Trend immer mehr in die Berücksichtigung des Taillenumfangs bei der Diagnosestellung. Die Tabelle 2 gibt einen Überblick über die neu definierten klinischen Parameter zur Diagnose eines MetS.

Tabelle 2: Definition des MetS

Kriterien für die Diagnose eines MetS (2009)	
Taillenumfang	Populations- und länderspezifisch (Tabelle siehe Alberti et al. [10])
TG	≥ 1.7 mmol/l (150 mg/dl)
HDL-C	Männer: <1,0 mmol/l (40 mg/dl) Frauen: <1.3 mmol/l (50 mg/d)
Blutdruck	≥ 130/85 mmHg
Nüchtern-Blutglukose	≥ 5.6 mmol/l (100 mg/dl)

2.1.2 Epidemiologie des MetS

Eines wird bei der Betrachtung der Daten klar: das MetS hat sich zu einer Volkskrankheit besonders in den Industriestaaten entwickelt. Lebensstilveränderungen der letzten Jahrzehnte und die darauf basierende Entwicklung von Adipositas und anderer Syndromkomponenten spielen dabei die Hauptrolle.

Vergleicht man verschiedene Studien, so liegt die Prävalenz für ein MetS bei Männern in Deutschland bei 18% und bei Frauen bei 25% [11].

Im Folgenden soll nun auf die zugrunde liegenden pathophysiologischen Mechanismen des MetS eingegangen werden.

2.1.3 Komponenten des Metabolischen Syndroms

2.1.3.1 Adipositas

Übergewicht und Adipositas (Fettsucht, Fettleibigkeit) sind durch eine übermäßige Ansammlung von Fettgewebe im Körper gekennzeichnet. Die Adipositas wird heute als eine chronische Gesundheitsstörung verstanden. Sie ist gekennzeichnet durch eine über das Maß hinausgehende Vermehrung des Körperfetts. Nach WHO-Definition liegt eine Adipositas ab einem Body-Mass-Index (BMI) von 30 kg/m^2 vor [12]. Indikatoren für den Anteil von Körperfett und dessen Verteilung sind der Bauchumfang und das Taille-Hüft-Verhältnis (Waist to hip ratio = WHR).

Über die letzten 20 Jahre zeigt sich ein kontinuierlicher Prävalenzanstieg für Adipositas in Deutschland [13]. Die Prävalenz für Adipositas betrug 2008 in Deutschland 23,9% und die Prävalenz für

einen erhöhten Taillenumfang lag bei 39,5% [14]. Von 100 Patienten mit Adipositas haben 50 einen diagnostizierten T2DM.

Übergewicht und Adipositas sind mit erhöhter Morbidität (Hypertonie, T2DM, CVD etc.) und Mortalität assoziiert [15-17]. Nachdem Parameter wie Insulinresistenz, DM oder das Atheroskeroserisiko enger mit der WHR als mit dem BMI korrelieren [18], wird die WHR vielfach dazu verwendet, den Grad der Adipositas zu bestimmen. Die Maßzahl des WHR hat im Gegensatz zum BMI den Vorteil, dass die Verteilung des Fettgewebes auf die obere und untere Körperregion berücksichtigt wird. Menschen mit überwiegend abdominalen Fett, dessen Anteil durch den Taillenumfang bestimmt werden kann, haben ein erhöhtes Risiko an T2DM und CVD zu erkranken [19]. Deshalb spielt die Bestimmung des Taillenumfangs eine große Rolle bei der Diagnose des MetS. Die abdominale Adipositas ist ein markantes Merkmal vieler Patienten mit MetS.

Es ist also sinnvoll für die Diagnostik den Taillenumfang zu bestimmen, allerdings müssen hierbei die Unterschiede in verschiedenen Populationen und ethnischen Gruppen berücksichtigt werden [10]. Fakt ist, Übergewicht und Adipositas sind in der Bevölkerung epidemisch verbreitet. Etwa jeder dritte erwachsene Bundesbürger ist deutlich übergewichtig ($\text{BMI} \geq 30$) und sollte aus medizinischen Gründen Gewicht abnehmen [20], um das Risiko eines DM und CVD zu senken.

Das Fettgewebe dient nicht nur als ein Energiespeicher im Körper, sondern ist auch das größte endokrine Organ des menschlichen Körpers. Adipozyten sezernieren eine Vielzahl von biologischen Substanzen, wie verschiedene Hormone und Zytokine (Adiponektin, Chemerin, Leptin, Resistin, IL-6, TNF- α), die Blutdruck, Lipid- und Glukosemetabolismus, Inflammation und Atherosklerose modulieren können [21-24]. Adiponektin, eines der am Häufigsten sezernierten Proteine der Adipozyten, hat wichtige metabolische Funktionen. Es hemmt die hepatische Glukoneogenese [25], stimuliert die Fettsäure (FS) Oxidation in Leber und Skelettmuskulatur, stimuliert die Glukoseaufnahme in die Skelettmuskulatur und die Insulinsekretion [26], es moduliert zudem die Nahrungsaufnahme und den Energieumsatz [27], außerdem hemmt es die Expression von proinflammatorischen Zytokinen wie IL-6 und TNF- α . Beim Menschen sind die Serum-Adiponektinspiegel negativ mit verschiedenen Parametern des MetS korreliert. Dazu gehören Adipositas [28-29], Insulinresistenz [30] und T2DM [30]. Weitere wichtige Proteine, die im Fettgewebe sezerniert werden, sind Leptin und Resistin, wobei Resistin von den Makrophagen im Fettgewebe produziert wird. So hemmt Leptin die Nahrungsaufnahme, erhöht den Energieumsatz [31], stimuliert die FS-Oxidation in Leber, Pankreas und Skelettmuskulatur und stimuliert die Expression von proinflammatorischen Zytokinen. Resistin induziert Insulinresistenz in Mäusen und stimuliert ebenfalls die Expression proinflammatorischer Zytokine [32]. Bei der Adipositas werden durch die Zunahme des viszeralen Fettgewebes vermehrt proinflammatorische Zytokine ausgeschüttet, was zu einer schwachen systemischen Inflammation führt. TNF- α und IL-6 sind die dabei wohl am besten untersuchten Zytokine. Beide spielen eine Rolle bei der Entstehung einer Insulinresistenz [33-34].

Adipozyten setzen durch Lipolyse vermehrt freie Fettsäuren (FFS) frei, die einen entscheidenden Faktor für die Pathophysiologie der Insulinresistenz darstellen. Die Erhöhung der FFS kommt u. a. durch die verminderte Wirkung von Insulin auf die Antilipolyse, des verminderten Abbaus von Lipiden, zustande. Die FFS zirkulieren im Blutstrom an Albumin gebunden, werden von den Zellen aufgenommen und akkumulieren in der Leber, Skelettmuskulatur, Herz und den β -Zellen des Pankreas. An der Skelettmuskulatur bewirken erhöhte Spiegel FFS eine kompetitive Hemmung der Glukoseaufnahme und -verwertung [35]. Darüber hinaus stimulieren sie die Glukoneogenese in der Leber [36].

Das Fettgewebe ist ein aktives endokrines Organ, das eine Vielzahl von Stoffen sezerniert, die bei der Entstehung einer Insulinresistenz eine Rolle spielen.

2.1.3.2 Hypertonie

„Manifeste Hypertonie“ ist im medizinischen Fachjargon die Bezeichnung für einen krankhaft erhöhten Blutdruck. Laut WHO-Richtlinien beträgt der systolische Blutdruck dabei 140 mmHg oder höher; der diastolische Blutdruck nimmt einen Wert von 90 mmHg oder höher an. In Deutschland haben schätzungsweise ca. 25–30 Mio. Menschen einen zu hohen Blutdruck. Männer sind häufiger betroffen als Frauen.

Bei der überwiegenden Zahl der Erkrankungen kann keine eindeutige Ursache der Hypertonie ausgemacht werden. Ist das der Fall, spricht man von einer primären oder essentiellen Hypertonie. Kann hingegen eine zugrundeliegende Erkrankung für den erhöhten Blutdruck identifiziert werden, wird die Hypertonie als sekundär bezeichnet.

Bei bis zu 95 % der Patienten kann keine Ursache des erhöhten Blutdrucks ausgemacht werden. Denn die Pathogenese der primären Hypertonie ist komplex und konnte bislang nicht vollständig geklärt werden. Die essentielle Hypertonie ist multifaktoriell bedingt: Eine genetische Komponente spielt dabei eine Rolle; außerdem sind verschiedene Gen-Mutationen bekannt, die jedoch für sich genommen eine Erkrankung nicht erklären können [37].

Die Vorgänge, die zu einer Hypertonie im Rahmen eines MetS führen, sind sehr komplex. Hypertonie, Adipositas und Glukoseintoleranz treten oft gemeinsam mit Insulinresistenz auf [38]. Das Zustandekommen der Hypertonie kann vereinfacht wie folgt erklärt werden: Wird Insulin normalgewichtigen Personen intravenös verabreicht, erweitert es die Gefäße. Gleichzeitig kommt es zu einer Natriumretention in der Niere. Liegt eine Insulinresistenz vor, kann dieser Effekt des Insulins, die Vasodilatation, verloren gehen - und zusammen mit dem erhöhten Natriumgehalt zu einer Hypertonie führen.

Bluthochdruck ist außerdem als Risikofaktor für die Entwicklung von Atherosklerose zu sehen. Wird das Bluthochdruckrisiko noch durch Adipositas sowie einen weiteren Risikofaktor wie DM oder Dyslipoproteinämien ergänzt, besteht eine erhöhte Gefahr, im Laufe des Lebens eine Herz-Kreislauf-

Erkrankung zu erleiden. Abgesehen von dem erhöhten Atheroskleroserisiko bewirkt ein dauerhaft erhöhter Blutdruck eine Schädigung des Herzmuskels: Die Herzmuskulatur wird durch den hohen Blutdruck dicker und steifer. Die Herzkammer kann schlechter gefüllt werden; Symptome einer Herzinsuffizienz sind die Folge.

2.1.3.3 Dyslipoproteinämie

Bei Patienten mit MetS liegt typischer Weise eine Fettstoffwechselstörung vor. Sie ist gekennzeichnet durch erhöhte TG, hohes VLDL-Cholesterin und niedriges HDL-C. Das LDL-Cholesterin liegt nur wenig über dem Normalwert [39]. Durch vermehrte Insulinausschüttung kommt es u. a. zu einer höheren Fettsäure- und Triglyceridsynthese in der Leber. Ein Überangebot von FFS bei erhöhter Lipolyse aus dem Fettgewebe sowie eine hyperkalorische Nahrungszufuhr sind weitere Folgen.

Dieses Lipidprofil hat - neben den hohen Blutglukosewerten - einen wichtigen Anteil an dem erhöhten Atheroskleroserisiko bei Patienten mit MetS. Jeder dritte Deutsche leidet an einer Störung des Lipidstoffwechsels und hat aufgrund vermehrten VLDLs erhöhtes Gesamtcholesterin. Die Veränderung des Lipidprofils wurde unter anderem in der UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) beschrieben. Patienten mit einem neu manifestiertem Diabetes hatten höhere TG (64 %), leicht erhöhtes Gesamtcholesterin und niedrigeres HDL-C (Männer 11%; Frauen 26%) als Kontrollpersonen. Das LDL-Cholesterin war nicht signifikant verändert [40].

Die Pathogenese der diabetischen Dyslipoproteinämie ist komplex. Die zentralen pathophysiologischen Komponenten dieser Fettstoffwechselstörung sind Hypertriglyzeridämie und Insulinresistenz. Bei der Entstehung der Hypertriglyzeridämie spielen unterschiedliche Faktoren, wie etwa die gesteigerte Freisetzung von FFS aus dem viszeralen Fettgewebe proportional zu seiner Masse, eine Rolle. Außerdem zu erwähnen ist die durch Freisetzung von Adipokinen aus dem viszeralen Fettgewebe und durch verminderte Insulinwirkung ansteigende Fettsäuresynthese in der Leber. Erhöhte hepatische Produktion von VLDL als Resultat des vermehrten Einstroms FFS in die Leber sowie die Abnahme der Aktivität der Lipoproteinlipase (LPL) in Muskel- und Fettgewebe bei Insulinresistenz und durch proinflammatorische Zytokine (IL-6, TNF α) tragen ebenfalls zur Hypertriglyzeridämie bei.

TG aus VLDL und Chylomikronen werden sehr rasch durch die LPL hydrolysiert. Durch die Aufnahme der FS in die verschiedenen Gewebe verändert sich der Apo-Proteingehalt. Es entstehen cholesterinreiche Restpartikel (sogenannte Remnants). Remnants werden schnell hepatisch eliminiert. Ihre Plasmakonzentration korreliert direkt mit den Plasmatriglyzeridspiegeln und ist postprandial am höchsten. Neben der Geschwindigkeit der plasmatischen Lipolyse und der hepatischen Aufnahme wird die Remnant-Konzentration von der hepatischen Lipase, deren Expression und Aktivität bei Insulinresistenz erhöht ist, beeinflusst. Die diabetische Dyslipoproteinämie ist durch eine verstärkte Bildung von kleinen, dichten LDL-Partikeln (sdLDL) charakterisiert („Typ B“-Phänotyp nach Austin et al.

1990 [41]). Bei erhöhtem Triglyzeridangebot aus VLDL oder Chylomikronen werden diese TG durch das Cholesterylester-Transferprotein (CETP) im Austausch gegen Cholesterylester vermehrt auf LDL-Partikel übertragen. Dort werden sie durch die bei Insulinresistenz erhöhte hepatische Lipase hydrolysiert. Übrig bleiben kleinere und dichtere LDL-Partikel. Aufgrund dieses Entstehungsweges sinkt die LDL-Partikelgröße mit steigenden Plasmatriglyzeridspiegeln (Lahdenpera et al. 1996 [42]). Die Mechanismen, die zur Entstehung von sdLDL-Partikeln führen, sind sehr komplex und der hier aufgeführte Weg über CETP ist nur ein möglicher. Der bevorzugte Abbau von VLDL zu sdLDL in der Hypertriglyceridämie ist eine weitere Erklärung [43].

Ähnlich der sdLDL-Bildung entsteht die Verringerung des HDL-C bei diabetischer Dyslipidämie. Erhöhte Plasmatriglyzeride in VLDL oder Chylomikronen führen zu einem vermehrten, durch das CETP vermittelten, Austausch von TG gegen Cholesterylester auf große HDL2-Partikel. Diese TG werden dort wiederum durch die hepatische Lipase hydrolysiert. Es entstehen kleinere HDL3-Partikel, die rasch metabolisiert werden und danach nicht mehr für den reversen Cholesterintransport und den Endothelschutz zur Verfügung stehen. Apolipoprotein A1, dissoziiert von den kleinen HDL-Partikeln, wird renal filtriert und in den renaltubulären Zellen degradiert. Die verminderte plasmatische Triglyzeridhydrolyse bei Insulinresistenz kann diesen Prozess durch vermindertes Lipoprotein-Remodelling unterstützen.

Unabhängig vom Vorliegen eines DM sind erhöhtes LDL-Cholesterin und vermindertes HDL-C als Risikofaktoren für die Entwicklung von CVD zu sehen [44-45].

Das Risiko der Atheroskleroseentstehung wird durch die bestehende Dyslipoproteinämie sowie durch die aufgrund Zytokine wie TNF- α und IL-6 hervorgerufene systemische Inflammation zusätzlich erhöht [46-48]. Proinflammatorische Zytokine können entweder direkte atherosklerotische Effekte haben [46] oder indirekte Auswirkungen über die Förderung von Thrombose [46] und lokaler Inflammation in den Gefäßwänden zeigen [46-47]. Die Atherosklerose stellt einen polyätiologischen Krankheitsprozess dar, bei dem sich Veränderungen der Gefäßwände und metabolische Störungen überlagern.

Auch Koronare Herzkrankheiten (KHK), also Erkrankungen der Herzgefäße, entstehen durch die Atherosklerose und können zu einem Herzinfarkt führen. Die KHK ist heute die häufigste Todesursache in den Industriestaaten [49].

2.1.3.4 Glukoseintoleranz, Insulinresistenz und Diabetes Mellitus

Das verminderte Ansprechen der Körperzellen auf Insulin wird als Insulinresistenz bezeichnet. Vor allem Muskulatur, Leber und Fettgewebe, also die Hauptgewebe des Glukose- und Lipidstoffwechsels, reagieren weniger empfindlich auf Insulin. Folglich wird unter anderem die vom Insulin stimulierte Glukoseaufnahme in den Zellen gehemmt. Es kommt zu einem erhöhten Blutglukosespiegel, man spricht von einer Glukoseintoleranz. Die physiologische Reaktion auf die verminderte Glukoseaufnahme ist

zunächst eine vermehrte Insulinsekretion aus den β -Zellen des Pankreas. Damit soll die Glukoseaufnahme in die Zellen ausgeglichen werden. In Folge der vermehrten Insulinausschüttung kommt es zu einem Rückkopplungsmechanismus an den Zielzellen: Der Insulinrezeptor wird von der Zellmembran entfernt und gleichzeitig wird die Expression des Rezeptors herab reguliert, so dass die durch Insulin stimulierte Zellantwort vermindert wird.

Insulin ist zuständig für die Synthese von FS und den Aufbau von Glykogen aus Glukose in der Leber. Die hepatische Insulinresistenz ist mit einer erhöhten Nüchtern-Blutglukose assoziiert. In der Skelettmuskulatur vermittelt Insulin eine vermehrte Glukoseaufnahme in die Zellen und veranlasst eine gesteigerte Glykogensynthese. Im Fettgewebe bewirkt Insulin vor allem die Speicherung von überschüssiger Glukose in Form von TG in Vakuolen im Zytosol der Zellen. Eine periphere Insulinresistenz ist durch eine pathologische Glukosetoleranz charakterisiert.

In den meisten Fällen tritt die Insulinresistenz im Rahmen der Adipositas [50-51] und eines T2DM [52] auf. 12% der 20- bis 79-Jährigen sind betroffen - insgesamt sind das 7,5 Mio Menschen. 90% der T2DM Erkrankten haben eine Insulinresistenz [53].

Die bestehende Insulinresistenz und eine systemische Inflammation erhöhen das Risiko, an einem T2DM zu erkranken, deutlich. Der Prozess hin zu einem manifesten DM ist ein schleichender, der lange vor der Diagnose einer Hyperglykämie stattfindet [54]. Zum Zeitpunkt der Diagnose sind 50% der β -Zellen bereits erschöpft und nicht mehr in der Lage Insulin zu produzieren und zu sezernieren. Mehr als 75% aller Diabetiker sterben an akuten Gefäßverschlüssen, vor allem am Herzinfarkt [53].

Der Verlauf des T2DM lässt sich wie folgt beschreiben: Zunächst besteht eine Insulinresistenz, die Zellen sprechen weniger auf Insulin an als üblich. Durch eine erhöhte Insulinsekretion aus den β -Zellen des Pankreas wird dies zunächst wieder ausgeglichen. Die vermehrte Ausschüttung von Insulin führt aber zu einem negativen Feedbackloop, in dem weniger Insulinrezeptoren an der Zelloberfläche lokalisiert sind. Die Weiterleitung des Insulinsignals ist deutlich vermindert. Die erhöhte Sekretion von Insulin führt im Laufe der Zeit zu einer Erschöpfung der β -Zelle, so dass irgendwann kein oder kaum Insulin produziert und sezerniert werden kann. Die Regulation der β -Zelle ist schon im frühen Stadium der Diabetesentstehung gestört und trägt so aktiv zur Manifestation des Diabetes bei. Bei der Entstehung eines DM spielt aber außerdem eine genetische Disposition eine wichtige Rolle. Das Peroxisome proliferator-activated receptor γ und insulin receptor substrate-1 Gen gehören zu den Genen, die mit der Entwicklung eines DM im Zusammenhang stehen [54].

Laut einer Studie der IDF werden bis zum Jahr 2030 ca. 7,8% der Weltbevölkerung an Diabetes erkrankt sein [55]. DM ist heute eine der am weitesten verbreiteten globalen Krankheiten und ist die viert oder fünft häufigste Todesursache in den Industriestaaten. DM hat eine Vielzahl von Folgeerkrankungen wie koronare Herzkrankheiten, Retinopathie, Neuropathien, Nephropathie und den

diabetischen Fuß. Man kann DM getrost als eine der größten gesundheitlichen Herausforderungen des 21. Jahrhunderts bezeichnen.

Ein gemeinsamer Nenner, der zu der Entwicklung von Insulinresistenz führt, sind erhöhte FFS im Plasma. An Albumine gebundene FFS kommen hauptsächlich aus den im Fettgewebe gespeicherten TG, die durch die Aktivierung von zyklischen AMP-abhängigen Enzymen freigesetzt werden. FS stammen außerdem aus der Lipolyse von triglyceridreichen Lipoproteinen in Geweben, wo sie durch LPL-Aktivität freigesetzt werden [56]. Wenn es also zu der Entstehung einer Insulinresistenz kommt, sorgt die erhöhte Lipolyse von gespeicherten TG im Fettgewebe für mehr FFS. Diese inhibieren weiter die antilipolytischen Effekte von Insulin, was im weiteren Verlauf zu vermehrter Lipolyse führt.

FFS können in Insulin-sensitiven Geweben die Weiterleitung des Insulinsignals verändern. So wird etwa im Muskel die Aktivität von Akt1 und der AMP-activated kinase α (AMPK α), zwei wichtigen Proteinen im Signalweg des Glukose- und Lipidstoffwechsels, vermindert.

Bei der Entstehung einer Insulinresistenz muss ebenfalls ein Auge auf Adipokine geworfen werden. Adipokine beeinflussen viele metabolische Stoffwechselvorgänge, ihre Expression wird von einer vorliegenden Insulinresistenz gestört. So stimuliert Adiponektin, das von Adipozyten sekretiert wird, die Glukoseaufnahme und Fettsäureoxidation im Skelettmuskel, reduziert die hepatische Glukoneogenese und verbessert die Insulinsensitivität verschiedener Gewebe [57]. Adiponektin aktiviert AMPK und andere Signalwege; die Expression ist bei Adipositas herab reguliert [57]. Andere Adipokine wie Chemerin, Leptin, Omentin, Resistin oder TNF- α sind weitere wichtige Faktoren, die bei der Insulinresistenz eine Rolle spielen [57].

2.2 Der Insulinsignalweg

2.2.1 Insulin

Insulin ist ein Hormon, das von den β -Zellen der Langerhansschen Inseln des Pankreas produziert und ins Blut sezerniert wird. Insulin besteht aus 51 Aminosäuren (AS), zwei Peptidketten (A-Kette mit 21 AS und die B-Kette mit 30 AS), die durch zwei Disulfidbrücken verbunden sind. Wichtige Funktionen, die von Insulin beeinflusst werden, sind: die Aufnahme von Glukose, FS und AS Fettgewebe und Muskulatur durch Translokation von Glukosetransporter Typ 4 (GLUT4) zur Zellmembran, die Speicherung dieser Nährstoffe in Form von Glykogen, in Leber und Muskulatur, Steigerung der Triglyceridsynthese in Leber und Fettgewebe. Außerdem hemmt Insulin die hepatische Glukoneogenese sowie die Glykogenolyse. Eine weitere wichtige Funktion von Insulin ist die Regulation des Zellwachstums und der Proliferation oder Apoptose von Zellen durch Aktivierung von Genen, die den Zellzyklus kontrollieren [58-59].

2.2.2 Der Insulinrezeptor und Insulinsignalweg

Der Insulinrezeptor besteht aus zwei α -Extrazellulärendomänen und zwei β -Transmembrandomänen, die durch Disulfidbrücken miteinander verbunden sind und so einen $\alpha_2\beta_2$ heterotetrameren Komplex bilden. Insulin kann nun an eine der extrazellulären α -Untereinheiten binden und so durch Konformationsänderung intrazellulär die Tyrosinkinaseaktivität der β -Untereinheiten aktivieren, was zu einer Autophosphorylierung von Tyrosin-Resten der β -Untereinheiten führt [60]. Diese phosphorylierten Tyrosin-Reste werden von den Phosphotyrosine-Binding (PTB)-Domänen verschiedener Adaptorproteine, z. B. der Insulinrezeptor Substrat Familie (IRS), Gab-1, Cbl oder APS, erkannt [61]. Nach der INSR Aktivierung und Phosphorylierung von IRSs binden Proteine, die eine sogenannte Src-Homologie 2 (SH2)-Domäne besitzen, wie Grb2, Nck oder Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K), an die Adaptoren und aktivieren weitere stromabwärtsgelegene Signalmoleküle, die eine Kaskade komplexer Ereignisse auslösen.

Im Folgenden sollen besonders auf den PI3K-Signalweg, sowie die Aktivierung der AMP-aktivierten Proteinkinase α (AMPK α) nach Insulinstimulation eingegangen werden.

2.2.2.1 Der PI3K-Signalweg

PI3K ist eines der Schlüsselenzyme im Insulinnetzwerk der Insulin stimulierten GLUT4 Translokation zur Zellmembran und die durch GLUT4 vermittelte Aufnahme von Glukose in die Zellen [62]. Gezeigt werden konnte die zentrale Bedeutung von PI3K dadurch, dass Inhibitoren bzw. dominant-negative Mutanten von PI3K die Glukoseaufnahme in Zellen und unterdrücken [62-63].

Nach Aktivierung der PI3K phosphoryliert diese wiederum Phosphatidylinositol (3, 4, 5)-Bisphosphate (PIP₃). Im nächsten Schritt werden nun die Proteinkinase C (PKC), Proteinkinase 3-phosphoinositide-

dependent protein kinase-1 (PDPK1) und auch die Proteinkinase B (PKB oder auch Akt genannt) aktiviert (Abbildung 2-1).

Bei Akt handelt es sich um ein 57 kDa großes Protein, das in drei Isoformen vorkommt (Akt1, Akt2 und Akt3) [64]. Im Skelettmuskel wird vorwiegend Akt1 und im Fettgewebe Akt2 exprimiert [65]. Die Aktivierung von Akt spielt eine wichtige Rolle bei der durch GLUT4 vermittelten Glukoseaufnahme in die Zellen [66], eine Inhibierung von Akt vermindert die Insulin stimulierte Glukoseaufnahme in die Zellen [67]. Akt phosphoryliert und deaktiviert dadurch die Glykogensynthasekinase 3 (GSK3) [68] (Abbildung 2-1). Das Hauptsubstrat der GSK3 ist die Glykogensynthase, deren Phosphorylierung durch GSK3 inhibiert die Glykogensynthese. Die Inaktivierung von GSK3 durch Akt aktiviert die Glukosespeicherung in den Zellen in Form von Glykogen.

Akt aktiviert auch Transkriptionsfaktoren der FoxO Familie, die die Transkription von Schlüsselgene der Glukoneogenese wie Phosphoenolpyruvatcarboxykinase (PEPCK) und der Glukose-6-Phosphatase (G6P) inhibiert [69].

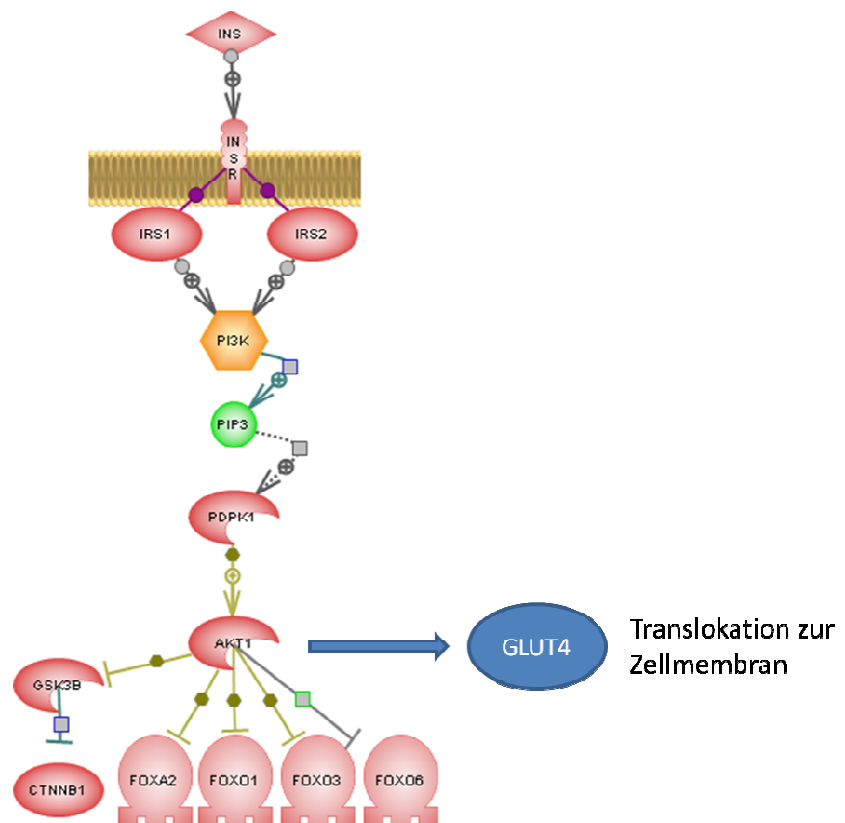


Abbildung 2-1: Schematische Darstellung des PI3K/Akt-Signalwegs. Insulin (INS) bindet an den Insulinrezeptor (INSR). An den phosphorylierten INSR bindet Phosphoinositol-3-Kinase (PI3K) und aktiviert Phosphatidylinositol (3, 4, 5) bisphosphate (PIP₃). Im Folgenden wird durch PIP₃ die Protein kinase 3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1 (PDPK1) aktiviert, die ihrerseits Akt1 phosphoryliert. Akt1 inhibiert Glykogensynthasekinase 3 beta (GSK3B) und Transkriptionsfaktoren der FoxO Familie. (verändert nach: ariadnegenomics.com)

2.2.2.2 AMPK α und Insulinsignalweg

AMPK ist ein Enzym, das an der Regulation verschiedener Stoffwechselvorgänge, wie Glukose- und Lipidmetabolismus (z. B. Fettsäureoxidation) beteiligt ist [70]. AMPK ist eine Serin/Threonin-Kinase, gehört zu der Familie der „Energie-Sensoren“ und wird, z. B. durch zellulären Stress, resultierend in einem akuten Anstieg des Verhältnisses AMP/ATP aktiviert. AMPK hat in unterschiedlichen Geweben verschiedene Funktionen. Im Skelettmuskel sorgen viele verschiedene Stimuli für die Aktivierung von AMPK, so z. B. Belastung durch Muskelkontraktionen, Hypoxie, Ischämie und osmotischen Stress. In der Leber resultiert die Aktivierung von AMPK in der Oxidation von Fettsäuren und eine verminderte Produktion von Glukose, Cholesterol und TG [71], im Fettgewebe führt die Aktivierung vom AMPK zu Lipolyse und auch Lipogenese [72]. Interessanterweise scheinen auch Adipokine, wie Adiponektin [73] und Leptin [74], AMPK aktivieren zu können. AMPK Aktivierung erhöht im Muskel den zellulären Glukosetransport [75], ähnlich wie die durch Insulin vermittelte Glukoseaufnahme.

AMPK ist ein heterotrimeres Protein, das aus den drei Untereinheiten α , β und γ besteht. Von den Untereinheiten findet man verschiedene Isoformen, $\alpha 1$ und $\alpha 2$, $\beta 1$ und $\beta 2$, $\gamma 1$, $\gamma 2$ und $\gamma 3$, mit gewebespezifischer Verteilung. Die α -Untereinheit besitzt die katalytische Aktivität des Proteins [70]. Die Aktivierung erfolgt durch Konformationsänderungen und/oder durch Phosphorylierung der α -Untereinheit durch AMPK-Kinasen (AMPKK), wie LKB1 [76] und Ca^{2+} Calmodulin Kinase Kinase (CaMKK) [77] (Abbildung 2-2).

Eine Zielprotein von AMPK ist AS160 (Abbildung 2-2). AS160 ist ebenfalls ein Substrat von Akt im Insulinsignalweg, denn AMPK und Akt besitzen die gleichen Substratmotive, was unter anderem die GLUT4-Translokation durch Insulin zu modulieren scheint [78-79]. Weitere Untersuchungen sind nötig, um diese Vermutungen zu bestätigen. Es könnte aber eine Erklärung für die verstärkte Glukoseaufnahme nach Insulinstimulierung in die Zellen sein.

AMPK kann aber auch die Insulinsensitivität der Muskulatur nach körperlicher Bewegung verbessern. So scheint AMPK direkt Komponenten des Insulinsignalwegs zu regulieren. Denn AMPK phosphoryliert IRS-1 [80], was zu einer erhöhten PI3K-Aktivität und der damit verbundenen Glukoseaufnahme in die Zelle führt (Abbildung 2-2).

Bekannt ist, dass das Medikament Metformin den Glukosetransport in die Zellen über die direkte AMPK-Aktivierung erhöht [81] (Abbildung 2-2).

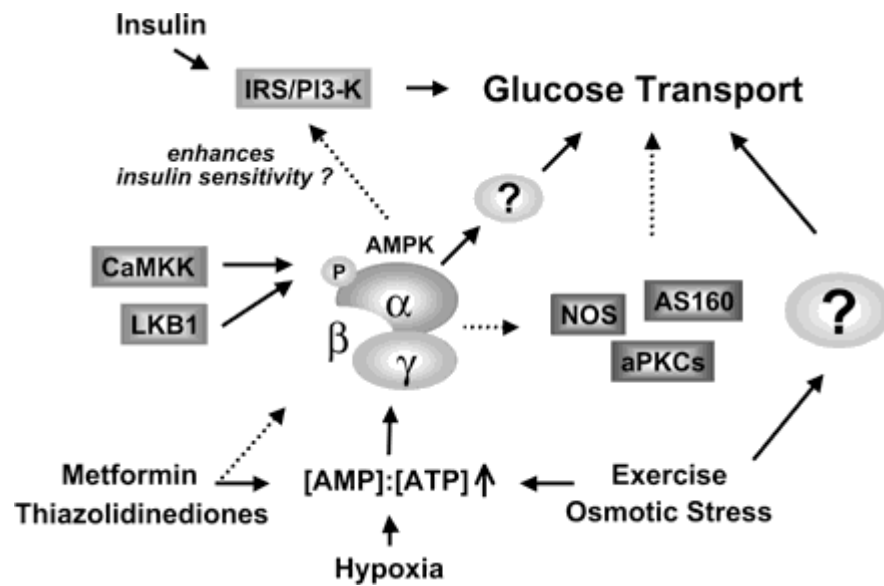


Abbildung 2-2: Schematische Darstellung der Rolle von AMPK im Glukosetransport. Stimuli, die eine Erhöhung des AMP/ATP-Verhältnisses auslösen, aktivieren AMPK und induzieren so den Glukosetransport. Hypoxie induzierter Glukosetransport scheint ausschließlich AMPK vermittelt zu sein, während durch Bewegung und osmotischen Stress vermittelte Glukoseaufnahme gleichzeitig durch andere Signalwege induziert werden. Metformin und Thiazolidinedione, aktivieren ebenfalls AMPK. Die potentielle Rolle von AMPK bei der Erhöhung der Insulinsensitivität ist bisher wenig verstanden. → Stehen für bekannte Verknüpfungen zwischen Stimuli, Signalen und Glukosetransport; ---> Stehen für mögliche Interaktionen. (aus Fuji et al., 2006 [82]).

2.3 Zytokine

Der Begriff Zytokine steht heute für eine Gruppe kleiner löslicher Proteine oder Glykoproteine (~25kDa), die als interzelluläre Mediatoren sowohl unter physiologischen als auch pathologischen Bedingungen funktionelle Aktivitäten von Zellen und Geweben modulieren. Dabei sind sie an zahlreichen Prozessen beteiligt wie Zellwachstum- und Differenzierung, Apoptose, Angiogenese, Homeöostase und Hämatopoese und spielen insbesondere in der Regulation der angeborenen und adaptiven Immunantwort eine entscheidende Rolle. Zytokine werden generell von jeder kernhaltigen Zelle im Körper auf einen aktivierenden Stimulus hin freigesetzt und induzieren eine Antwort durch Binden an spezifische Rezeptoren auf der Oberfläche der Zielzellen. Die interzelluläre Signalübermittlung kann lokal durch Wirkung des Zytokins auf die sezernierende Zelle selbst (autokrin) oder auf benachbarte Zellen (parakrin) erfolgen. Abhängig von ihrer Konzentration, der Halbwertszeit und der Möglichkeit in den systemischen Kreislauf einzutreten, wirken Zytokine auch auf entfernte Zellen und Gewebe (endokrin). Eine weitere charakteristische Eigenschaft der Zytokine ist ihre Pleiotropie. Da die Rezeptoren auf unterschiedlichen Zielzellen exprimiert werden, kann ein Zytokin für verschiedene biologische Effekte verantwortlich sein. Zytokine zeigen auch Redundanz: Ähnlichkeiten in der cytosolischen Domäne der Rezeptoruntereinheiten führen zu überlappenden oder weitgehend identischen Aktivitäten verschiedener Zytokine. Eine klare Einteilung der Zytokine hat sich in der Vergangenheit immer wieder als problematisch erwiesen. Die Terminologie richtete sich entweder nach dem Typ der sezernierenden Zelle und Zielzelle oder der beobachteten Funktion des Zytokins. Zahlreiche Akronyme und verschiedene Oberbegriffe wurden in der Vergangenheit auf diese Weise geprägt. Heute teilt man die Zytokine in die großen Familien der Hämatopoietin-, Interferon-, TNF-, IL-1/Tolllike-, Tyrosinkinase- sowie die Chemokin-Rezeptorfamilie ein. Jede Familie ist über homologe Sequenzen in der cytosolischen Domäne der Rezeptoruntereinheit definiert und besitzen ähnliche funktionelle Aktivitäten [83].

2.3.1.1 Adipokine

Das Fettgewebe dient nicht nur als Energiespeicher sondern wird mittlerweile als das größte endokrine Organ in unserem Körper betrachtet. Adipozyten sezernieren eine Vielzahl von biologischen Substanzen (Hormonen, Zytokine), die im allgemeinen als Adipokine bezeichnet werden [24]. Dazu gehören unter anderem Adiponektin, Leptin, TNF- α , und IL-6 [84]. Weitere Adipokine sind Plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1), Angiotensinogen, Resistin, Visfatin und auch verschiedene Glukocortikoide. Diese Adipokine können unter anderem eine Insulinresistenz vermitteln [21, 23]. Sie regulieren aber auch systemische Prozesse, wie Nahrungsaufnahme und den Nährstoffmetabolismus, Insulinsensitivität, Stressantworten, Fortpflanzung, Blutdruck und Inflammation. Autokrine/parakrine Faktoren der Adipozyten beeinflussen die Fettgewebsentwicklung und den Fettgewebsmetabolismus, das

Gefäßwachstum im Fettgewebe und die Rekrutierung inflammatorischer Zellen, wie Leukozyten und Makrophagen im Fettgewebe.

So stimuliert TNF- α die Lipolyse im Fettgewebe, hemmt die LPL-Aktivität [85] und die Tyrosinkinasephosphorylierung des Insulinrezeptors und blockiert so die Signalweiterleitung, was zu einer Insulinresistenz führt [86]. Die Adipositas ist ein proinflammatorischer Zustand, in dem das Sekretionsprofil von Adipokinen aus Adipozyten verändert wird, was dann zu einer Änderung der Insulinsensitivität der Gewebe und systemischer Inflammation führen kann [87]. Dieser Prozess stellt einen wichtigen Aspekt in der Entstehung des MetS dar [88-90].

2.3.2 Chemerin

2.3.3 Entdeckung von Chemerin

Chemerin, auch bezeichnet als Tazarotene-induced gene 2 (TIG2) oder Retinoic acid receptor responder 2 (RARRES2), wurde zuerst 1997 als ein bisher unbekanntes durch Tazarotene induziertes Gen bei Patienten in von Schuppenflechte (Psoriasis) befallenen Hautpartien entdeckt [91]. Doch erst 2003 wurde eine mögliche biologische Funktion von Chemerin beschrieben, als von Wittamer et al. gezeigt werden konnte, dass es sich bei Chemerin um einen sekretierten Liganden des G-Protein gekoppelten Rezeptors Chemokine-like-receptor 1 (CMKLR1 = ChemR23) handelt [92]. Der CMKLR1 wird in verschiedenen Geweben exprimiert, dazu gehören Fettgewebe, Lunge, Milz, Dendritische Zellen und Makrophagen [92-93]. Bis heute konnten noch zwei weitere Rezeptoren für Chemerin identifiziert werden, der Chemokine (C-C motif) receptor like (CCRL2) receptor und der G protein-coupled receptor (GPR) 1 [94-95]. CCRL2 dient möglicherweise als Korezeptor, der das freie Chemerin bindet, und so für eine stabilere Bindung an den CMKLR1 zu sorgen [96].

Chemerin wurde als ein Hepatoadipokin, da es unter anderem im Fettgewebe und der Leber exprimiert wird, beschrieben [92-93]. Es reguliert die Differenzierung von Präadipozyten zu Adipozyten und moduliert die Expression von Genen des Glukose- und Lipidmetabolismus in Adipozyten in vitro [97-98].

Chemerin spielt eine Rolle bei der Chemotaxis und Aktivierung von Dendritischen Zellen (DCs) und Makrophagen bei inflammatorischen Vorgängen [92, 99-101].

2.3.4 Struktur und Prozessierung von Chemerin

Chemerin wird als 163 AS großes Prä-Prochemerin translatiert. Das sezernierte Prochemerin besitzt 143 AS (18 kDa), welches durch proteolytische Abspaltung des N-terminalen Signalpeptides entsteht [92, 102]. Prochemerin besitzt eine geringe biologische Aktivität und wird extrazellulär durch C-terminale

Prozessierung von Serumproteasen aktiviert (Abbildung 2-3). Eine ganze Reihe von Carboxypeptidasen und Serin-Proteasen der Koagulation-, Fibrinolytischen- und Inflammatorischen-Kaskade können Chemerin aktivieren, dazu gehören unter anderem Cathepsin G, Elastase und Plasmin [92, 96, 101-103] (Abbildung 2-3). Manchmal sind auch mehrere Schritte notwendig, um Chemerin vollständig zu aktivieren [104] (Abbildung 2-3). Durch die proteolytische Spaltung von Chemerin können Peptide entstehen, die sowohl pro- als auch antiinflammatorische Effekte hervorrufen können. Cash et al. haben gezeigt, dass synthetische C-terminale Chemerinpeptide der AS140-AS154, die Rekrutierung von Neutrophilen und Monozyten verhindert [95]. Wittamer et al. konnten hingegen zeigen, dass ein Nonapeptid von Chemerin, das dem C-Terminus entspricht, ein potenter Agonist des CMKLR1 ist [105].

Proteolytische Spaltung ist ebenfalls für die Inaktivierung von aktivem Chemerin verantwortlich [106-107] (Abbildung 2-3).

Diese komplexe Aktivierung von Chemerin durch proteolytische Spaltung durch Carboxypeptidasen und Serin-Proteasen stellt den Schlüsselmechanismus für die lokale und systemische Konzentration von biologisch aktivem Chemerin dar. Interessanterweise zeigen Untersuchungen mit synthetischen Chemerinpeptiden, dass Peptide mit den C-terminalen AS9-15 des Prochemerin viele der bisher bekannten biologischen Funktionen vermittelt werden können [95, 105, 108-109].

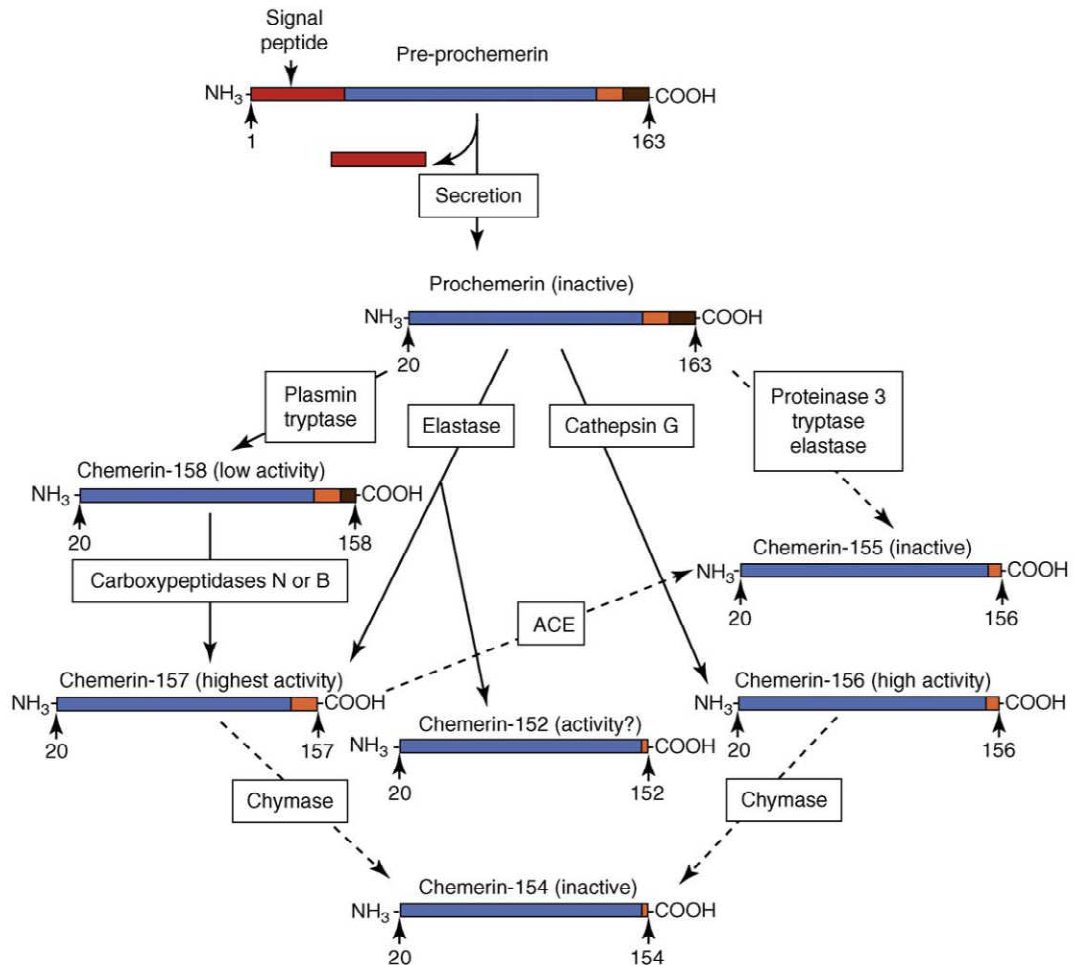


Abbildung 2-3: Proteolytische Prozessierung von Chemerin. Chemerin wird als Prä-Prochemerin (AS 1-163) synthetisiert. Die Sekretion des inaktiven Vorläuferproteins, Prochemerin (AS 20-163), erfordert eine N-terminale Prozessierung. Extrazelluläre Proteolyse des C-Terminus wandelt das Prochemerin in biologisch aktives Chemerin um. Cathepsin G spaltet 7 C-terminale AS des Chemerin ab (Chemerin-156); Elastase spaltet 6 AS (Chemerin-157), 8 AS (Chemerin-155) oder 11 AS (Chemerin-152) ab; Plasmin spaltet 5 AS (Chemerin-158) ab und Tryptase spaltet 5 AS (Chemerin-158) oder 8 AS (Chemerin-155) ab. Mehrere Prozessierungsschritte können nötig sein, um Chemerin vollständig zu aktivieren. Initial mit Spaltung durch Tryptase, was in einem Chemerin mit geringer biologischer Aktivität resultiert (Chemerin-158), gefolgt von einer zweiten Spaltung durch die Carboxypeptidase N oder B, was in dem vollständig aktivierten Chemerin (Chemerin-157) resultiert. Die Aktivierung von Chemerin-156 und -157 wird durch Spaltung durch Chymase zu Chemerin-154 (inaktives Chemerin) beendet. Chemerin-157 kann auch durch Spaltung von ACE zu Chemerin-155 inaktiviert werden. Die Nummer z. B. -155 steht für die terminale Aminosäureposition des prozessierten Proteins. → Stehen für Aktivierung; ---> Stehen für Inaktivierung. (aus Ernst et al., 2010 [110]).

2.3.5 Physiologische Rolle von Chemerin

2.3.5.1 Chemerin und Immunsystem

In vitro Daten haben gezeigt, dass Chemerin ein chemotaktisches Zytokin ist, das Immunzellen zu Orten von inflammatorischen Vorgängen rekrutiert und aktiviert.

Eine der ersten untersuchten Funktionen von Chemerin von Wittamer et al. ist Chemotaxis und Aktivierung von DCs und Makrophagen, durch Bindung an CMKLR1 [92]. Sie konnten zeigen, dass

Chemerin ein potentes Chemerin ist, das DCs und Makrophagen rekrutiert. Auch Zabel et al. stellten fest, dass Chemerin DCs durch Interaktion mit CMKLR1 rekrutiert [101]. Bei den Versuchen von Cash et al. gab es gegenteilige *in vitro* Daten. Sie konnten zeigen, dass synthetische Chemerinpeptide antiinflammatorische Eigenschaften haben und die Expression von proinflammatorischen Zytokinen wie IL-6 und TNF- α , herabregulieren sowie die Aktivierung von Makrophagen verhindern [95].

In vivo Studien belegen, dass Chemerin in von Psoriasis befallenen Hautpartien exprimiert wird [91]. Viele Zellen des Immunsystems, DCs, Monozyten, Makrophagen und natürliche Killerzellen (NKs), die durch Chemerin aktiviert werden, wurden mit Psoriasis in Verbindung gebracht [111-113]. Chemerin findet sich in einer Vielzahl von humanen Proben, wie inflammatorische Flüssigkeiten und Geweben, in hoher Konzentration [92].

Beim Menschen korrelieren die Serum-Chemerinspiegel mit dem Level proinflammatorischer Cytokine wie TNF- α , IL-6 und dem C-reaktiven Protein (CRP) [88, 90]. Dieser beobachtete Zusammenhang zwischen Serum-Chemerinspiegel und der Rekrutierung von Immunzellen legt nahe, dass Chemerin und CMKLR1 sowohl in die Rekrutierung als auch die Aktivierung von Immunzellen bei inflammatorischen Vorgängen involviert ist [114-115]. Dies konnte auch für andere Autoimmunerkrankungen belegt werden. Graham et al. zeigten, dass CMKLR1 knock out (KO) Mäuse, ein Modell für Multiple Sklerose, weniger schwere Symptome entwickeln als Kontrollmäuse [116]. Eine fehlende Aktivierung der Immunzellen durch die Chemerin/CMKLR1-Wechselwirkung könnte für diesen Phänotyp verantwortlich sein.

Weitere Untersuchungen der Effekte von Chemerin/CMKLR1 zeigen eine antiinflammatorische Wirkung von Chemerin. In einer Studie von Luangsay et al. [117], einem mit Lipopolysacchariden (LPS) induzierten Mausmodell, beobachtete man, dass eine Behandlung mit Chemerin gleichzeitig die Mobilisierung von Makrophagen erhöht und die Rekrutierung und Aktivierung von Neutrophilen vermindert. Somit scheint Chemerin sowohl pro- als auch antiinflammatorisch wirken zu können, wie schon Cash et al. *in vitro* zeigen konnten [95], je nach Art der proteolytischen Aktivierung. In dem Experiment von Cash et al. [95] mit synthetischen Chemerinpeptiden in einem Zymosan-induzierten Peritonitis-Modell gab es außerdem eine geringere Rekrutierung von Neutrophilen und Monozyten im Vergleich zu unbehandelten Tieren.

Adipositas geht mit einer schwachen systemischen Inflammation einher, deshalb spielt der Effekt von Chemerin auf inflammatorische Vorgänge im Fettgewebe eine potentielle Rolle. Adipozyten exprimieren Chemerin [97-98] und im Fettgewebe finden sich eine Reihe von Lymphozyten, wie Makrophagen, NKs und T-Zellen [118-120], die durch Chemerin aktiviert werden können. Bei Adipositas verändern sich molekulare und zelluläre Beschaffenheit des Fettgewebes, bzw. der Adipozyten, die systemisch den Metabolismus und die Inflammation verändern. So sind die Serumspiegel von proinflammatorischen Markern wie TNF- α , IL-6 und CRP bei Adipositas erhöht [34, 88, 90, 121] und das Fettgewebe scheint die

Hauptquelle dieser Zytokine zu sein [122]. Chemerin korreliert systemisch mit proinflammatorischen Markern wie TNF- α , IL-6 und CRP und ist in verschiedenen Populationen assoziiert mit Komponenten des MetS wie BMI, TG, HDL-C und dem Blutdruck [88, 90, 93, 97, 123]. In stark adipösen Patienten, die sich einer Magenverkleinerung unterzogen hatten, war der Gewichtsverlust assoziiert mit der Verbesserung metabolischer Parameter und eine verringerte Konzentration von Chemerin im Serum [124-125].

Des Weiteren korreliert Adipositas mit einem Anstieg von Makrophagen-Infiltration ins Fettgewebe, die in diesem Stadium bis zu 60% der Zellen im Fettgewebe ausmachen [119-120] und dort proinflammatorische Zytokine produzieren können. Bis jetzt konnte noch kein direkter Beweis zwischen Chemerin/CMKLR1-Wechselwirkung und der Inflammation im Fettgewebe gezeigt werden, aber die bisherigen Daten der Wirkungen von Chemerin auf die Immunfunktion lassen auf einen Effekt schließen.

2.3.5.2 Chemerin und Adipositas

2007 wurde zum ersten Mal beschrieben, dass sowohl Chemerin als auch CMKLR1 im Fettgewebe von Mäusen, Ratten und Menschen hoch exprimiert sind [97-98].

In vitro ist Chemerin wichtig für die Differenzierung von Prä-Adipozyten zu Adipozyten und beeinflusst den Metabolismus der Adipozyten. Goralski et al. haben gezeigt, dass Chemerin Sekretion aus Adipozyten die Signalweiterleitung durch den CMKLR1 beeinflusst. Mit Hilfe eines shRNA knockdown von Chemerin oder CMKLR1 konnten sie zeigen, dass keine Differenzierung von 3T3-L1 Zellen zu Adipozyten stattfindet, die Expression von Genen des Glukose- und Lipidmetabolismus herabreguliert wird und sich der Metabolismus der Adipozyten verändert [98]. Roh et al. untersuchten ebenfalls den Effekt von Chemerin auf 3T3-L1 Adipozyten und konnten zeigen, dass die Expression von Chemerin und CMKLR1 bei der Differenzierung von Prä-Adipozyten zu Adipozyten zunimmt. Außerdem zeigten sie, dass rekombinantes Chemerin die Phosphorylierung von ERK1/2 induziert und zu Lipolyse führt [126].

In vivo steigt Expression und Sekretion von Chemerin aus dem Fettgewebe dramatisch mit zunehmender Adipogenese und der Verlust von CMKLR1 verhindert die Differenzierung von Prä-Adipozyten zu Adipozyten [98, 127]. Bozaoglu et. al untersuchten die Expression von Chemerin in der Sandratte, *Psammomys obesus* (*P. obesus*), einem polygenetischen Tiermodell zur Untersuchung von Adipositas und T2DM. Sie haben gezeigt, dass die Expression von Chemerin und CMKLR1 im Fettgewebe von adipösen Tieren, im Vergleich zu normalgewichtigen Tieren hochreguliert ist. Durch subzelluläre Fraktionierung konnten sie zeigen, dass die Sekretion von Chemerin aus den Adipozyten des Fettgewebes stattfindet [97]. Serum-Chemerinspiegel korrelierten in diesem Tiermodell mit dem Körpergewicht. Takahashi et al. untersuchten die Expression von Chemerin in db/db-Mäusen, einem Tiermodell für Adipositas und DM. Sie zeigten, dass Chemerin im Fettgewebe und der Leber exprimiert wird, aber bei adipösen Tieren die Expression im Fettgewebe vermindert wird, während sie in der Leber

unverändert bleibt. Außerdem zeigten sie, dass die Serum-Chemerinspiegel der diabetischen db/db-Tiere niedriger sind als in nichtdiabetischen Tieren [128]. Die bisherigen Studien zeigen, dass Chemerin eine wichtige Rolle bei der Adipozyten-Differenzierung spielt und Einfluss auf den Metabolismus von Adipozyten hat.

Inzwischen belegt eine Vielzahl von humanen Studien den Zusammenhang zwischen Chemerin, Adipositas und dem MetS. In Patienten mit T2DM wurden signifikant höhere Serum-Chemerinspiegel gemessen als in gesunden Patienten, ebenso wurden höhere Spiegel in adipösen Patienten verglichen mit normalgewichtigen Probanden gemessen [93]. Auch aktuelle Tierstudien zeigen, dass adipöse und diabetische Mäuse erhöhte Serum-Chemerinspiegel aufweisen [129-130]. Diese Studien belegen, dass Chemerin eine Rolle im Glukose- und Lipidmetabolismus spielen könnte.

Weitere Untersuchungen haben gezeigt, dass neben der Assoziation von zirkulierendem Chemerin und Aspekten des MetS lokale Chemerinkonzentrationen eine Rolle bei der Entstehung von CVD spielen können. Eine Studie zeigte, dass atherosklerotische Plaques der Aorta und Koronararterien positiv mit der Chemerinexpression im periaortischen und perikoronaren Fettgewebe korreliert [131]. Das lässt vermuten, dass lokal exprimiertes Chemerin die Entstehung von Atherosklerose durch parakrine Mechanismen beeinflusst. Atherosklerose ist unter anderem eine inflammatorische Erkrankung, die mit der Akkumulation von Makrophagen in atherosklerotischen Plaques und dem Fortschreiten der Plaquesbildung einhergeht. Eine mögliche Erklärung wäre, dass die lokale Konzentration von Chemerin Makrophagen rekrutiert und so die inflammatorischen Vorgänge in den Plaques auslöst.

Serum-Chemerinspiegel hingegen sind nur schwach mit der Entstehung von atherosklerotischen Plaques korreliert [88].

Der Mechanismus, der zu den erhöhten Serum-Chemerinspiegeln im Rahmen der Adipositas führt, ist komplex. So erhöht Insulin die Sekretion von Chemerin aus dem Fettgewebe *in vitro* und in Gewebepräparaten [123]. Außerdem erhöhen IL-1 β und TNF- α , beide Faktoren sind assoziiert mit Insulinresistenz, die Expression von Chemerin in 3T3-L1 Adipozyten [130, 132], was die Hypothese unterstützt, dass Hyperinsulinämie und erhöhte proinflammatorische Zytokine mit Adipositas assoziiert sind.

Somit scheint Chemerin eine Rolle in der Pathophysiologie der Adipositas und des MetS zu spielen. Die genauen Funktionen von Chemerin bei Adipositas und dem MetS bleiben jedoch ungeklärt, weitere Untersuchungen werden nötig sein um die Assoziation von Serum-Chemerinspiegel, Adipositas und den Aspekten des MetS zu erhellen.

2.3.5.3 Chemerin und Glukosehomöostase

Adipositas ist ein Risikofaktor für die Entstehung einer Insulinresistenz und T2DM. Die Erhöhung der Adipokinsekretion im Rahmen der Adipositas scheint bei der Entwicklung dieser metabolischen

Störungen eine wichtige Rolle zu spielen [133-137]. Die erhöhten Serumspiegel von Chemerin, die im Rahmen einer Adipositas im Serum von Menschen und Mäusen gefunden wurden, legen nahe, dass Chemerin den Glukosemetabolismus beeinflusst.

In vitro Studien mit 3T3-L1 Adipozyten liefern widersprüchliche Ergebnisse, welchen Einfluss Chemerin auf den Glukosemetabolismus hat. Takahashi et al. zeigen eine durch Chemerin verstärkte insulinstimulierte Glukoseaufnahme in 3T3-L1 Adipozyten [128], während Kralisch et al. eine verminderte Glukoseaufnahme in die Zellen zeigen konnten [132]. Eine weitere Studie von Sell et al. hat gezeigt, dass die Behandlung von primären Muskelzellen mit Chemerin die Phosphorylierung von IRS1 an den Serinresten erhöht, was in einer verminderten insulinstimulierten Glukoseaufnahme resultiert [138]. Weiter zeigten sie, dass Chemerin, das unter anderem ERK1/2 phosphoryliert [126], durch Inhibierung der ERK Phosphorylierung eine Chemerin vermittelte Insulinresistenz verhindert werden konnte. Außerdem konnte eine verminderte Phosphorylierung von Akt1, GSK3 α und GSK3 β beobachtet werden [138].

In *in vivo* Untersuchungen in Mäusen zeigen Ernst et al., dass die akute Gabe von Chemerin die Glukoseintoleranz in obese/diabetic (ob/ob; db/db), aber nicht in normal glykämischen Wildtyp-Mäusen durch gesenkte Insulinspiegel verschlechtert, was eine verminderte Glukoseaufnahme ins Fettgewebe hervorruft und die Glukoseaufnahme in Leber und anderen Geweben reduziert [129].

Bozaoglu et al. zeigen in ihrer Studie in *P.obesus*, dass Serum-Chemerinspiegel mit dem Körpergewicht, Nüchtern-Blutglukose und dem Nüchtern-Plasmainulin korrelieren [97]. In klinischen Studien zeigte sich, dass die Serum-Chemerinspiegel in adipösen Patienten und Patienten mit T2DM assoziiert sind mit dem BMI, CRP, TNF- α , IL-6, Nüchtern-Seruminsulin, Serumglukose, TG, HDL-C und Blutdruck [88, 90, 93, 125, 139-140].

In vivo Untersuchungen zur klinischen Relevanz dauerhaft erhöhter Serum-Chemerinspiegel, wie man sie bei Patienten mit einem MetS findet, existieren bislang nicht.

2.4 Adeno-assoziierte Viren

2.4.1 Allgemein

Adeno-assoziierte Viren (AAV) gehören zu der Gattung der Dependoviren, in der Familie der Paroviren. AAVs sind nicht-pathogene humane Viren. Ihr Replikationszyklus ist von sogenannten Helferviren, normalerweise Adenoviren, abhängig, um sich in der Wirtszelle vermehren zu können. Ohne Präsenz eines Helfervirus liegen die AAVs episomal in postmitotischen Zellen [141] vor oder sie integrieren in das Genom mitotischer Zellen, bevorzugt auf dem Chromosom 19 [142-143]. Sie bestehen aus einem einzelsträngigen, linearen DNS-Genom von ca. 5kbp Größe und einem unbehüllten, ikosaedrischen Kapsid, dessen Durchmesser 18-30nm beträgt [144].

Bis 2006 sind 11 verschiedene Serotypen bekannt [145]. AAV1-4 und AAV6 wurden als Kontamination von Adenoviruspräparationen entdeckt [146], daher auch der Name Adeno-assoziierte Viren. AAV5 konnte aus einem humanen Kondylom isoliert werden [147] und erst 2002 gelang es die Serotypen AAV7 und AAV8 aus dem Gewebe von Rhesusaffen zu isolieren [148]. Alle bekannten Serotypen können Zellen unterschiedlichen Gewebes (z. B. Skelettmuskulatur, Endothelzellen, Retina, Leber) infizieren, wobei die Gewebespezifität durch die Kapsidproteine bestimmt wird [147, 149-153].

Der bestuntersuchte Serotyp ist der AAV2 [154-156], der auch in der vorliegenden Arbeit verwendet wurde. AAV2 zeigt eine natürliche Effizienz zur Infektion von Skelettmuskulatur [157], Neuronen [154], vaskuläre Endothelzellen [158] und Hepatozyten [159].

Der Hauptzellrezeptor mit dem AAV2 auf der Wirtszelle interagiert, um in die Wirtszelle einzudringen, ist das Heparansulfatproteoglykan (HSPG) [160]. Als Korezeptoren wurden $\alpha_v\beta_5$ -Integrin und der Fibroblast-Growth-Factor-1 (FGFR-1) beschrieben [161-162].

AAVs besitzen viele Eigenschaften, die sich ideal für einen Gentransfer eignen. Sie sind nicht pathogen und nicht fähig sich selbst zu replizieren, ohne Koinfektion von einem Helfervirus. Die Sicherheit des Vektors wird weiterhin durch das Entfernen sämtlicher Virus kodierenden Sequenzen gewährleistet. Lediglich die ITR-Sequenzen, die für das Verpacken des Virus zuständig sind, bleiben erhalten. Die Fähigkeit der AAVs, latente Infektionen hervorzurufen, kombiniert mit einer äußerst geringen Immunantwort, ermöglicht eine langfristige Transgenexpression in der Wirtszelle [163].

2.4.2 AAV2.8

In der vorliegenden Arbeit wurde die Kombination des AAV2 Genoms mit den Kapsidproteinen von AAV8 verwendet, um humanes Chemerin in der Leber der Versuchstiere zu exprimieren.

Die Expression eines fremden Antigens in der Leber führt oft zu keiner Immunreaktion gegen das Antigen, während die Präsentation des Antigens auf anderen Wegen zu teilweise starken

Immunreaktionen führt. Man nennt diesen Effekt den „Leber Toleranz Effekt“. Die Leber ist ein geeignetes Gentherapieziel für die Behandlung von angeborenen Krankheiten, die den Metabolismus beeinflussen [164].

Das Genom des AAV2 ist das am meisten untersuchte unter den AAVs. Es besitzt alle Eigenschaften, um als Vektor für den Gentransfer in Gewebe eingesetzt werden zu können. Die Kombination mit dem Kapsid des AAV8 bietet den Vorteil, dass die Vektoren zielgerichtet in die Gewebe gelangen. AAV8 ist hoch leberspezifisch mit einer großen Gentransduktionsrate in die Leber von Mäusen [165-166]. Außerdem induziert das AAV8 Kapsid eine schnellere Transgenexpression in der Leber verglichen mit den Kapsiden anderer Serotypen [167]. Trotz der hohen Leberspezifität beschränkt sich der AAV8 Tropismus nicht nur auf Leber, sondern auch auf andere Organe [168]. Die Verwendung von leberspezifischen Promotoren reduziert die Möglichkeit der Transgenexpression in anderen Geweben als der Leber. In der vorliegenden Arbeit wurde der leberspezifische Promotor Thyroid hormone-binding globulin promotor (TBG) [169] verwendet.

2.4.3 Struktur

Das Genom der AAVs lässt sich in folgende Elemente unterteilen:

2.4.3.1 Inverted terminal repeats (ITRs)

Die ITRs flankieren beide Enden des AAV-Genoms. Sie bestehen aus 145 Basenpaaren. ITRs sind symmetrisch aufgebaut und werden für die effiziente Replikation des Virus benötigt [170]. Aufgrund ihrer Sequenz formen die ITRs Hairpin Strukturen, die eine Self-Priming Funktion bei der Synthese des komplementären DNA-Stranges erfüllen. Außerdem werden sie für die Integration und Freisetzung der Virus DNA auf dem Chromosom 19 [171] sowie für die effiziente Verpackung der Virus AAV-DNA in komplette AAV-Partikel [172] benötigt.

2.4.3.2 Rep-Gene und Rep-Proteine

Am 5'-Ende des AAV-Genom finden sich offene Leserahmen, die von zwei Promotoren, p5 und p19, reguliert werden. Codiert sind hier vier Rep-Proteine, Rep78, Rep68, Rep52 und Rep40, benannt nach ihrer unterschiedlichen Größe in Kilodalton [173]. Rep78 und 68 sind für die Regulation der Genexpression [174], die Replikation [175-176] und die Integration ins Wirtsgenom [177] zuständig. Rep52 und 40 werden unter anderem für das Verpacken des AAV-Genoms in das virale Kapsid benötigt [178].

2.4.3.3 Cap-Gene und VP-Proteine

Am 3'-Ende des AAV-Genoms sind die Chemerinpeptide (VP1, VP2 und VP3) codiert. Reguliert wird deren Transkription durch den p40-Promotor. Alle drei Proteine werden von einer mRNA durch alternatives Spleißen prozessiert. Die drei Chemerinpeptide werden in einem Verhältnis von 1:1:20 translatiert [141]. Dies liegt an dem präferierten Startcodon AUG vor dem VP3-Gen, wohingegen VP2 das weniger bevorzugte Startcodon ACG besitzt [179-180]. Das Virus-Kapsid besteht aus 60 Protein Untereinheiten (VP1, VP2 und VP3), welche icosahedral symmetrisch zusammengefügt werden.

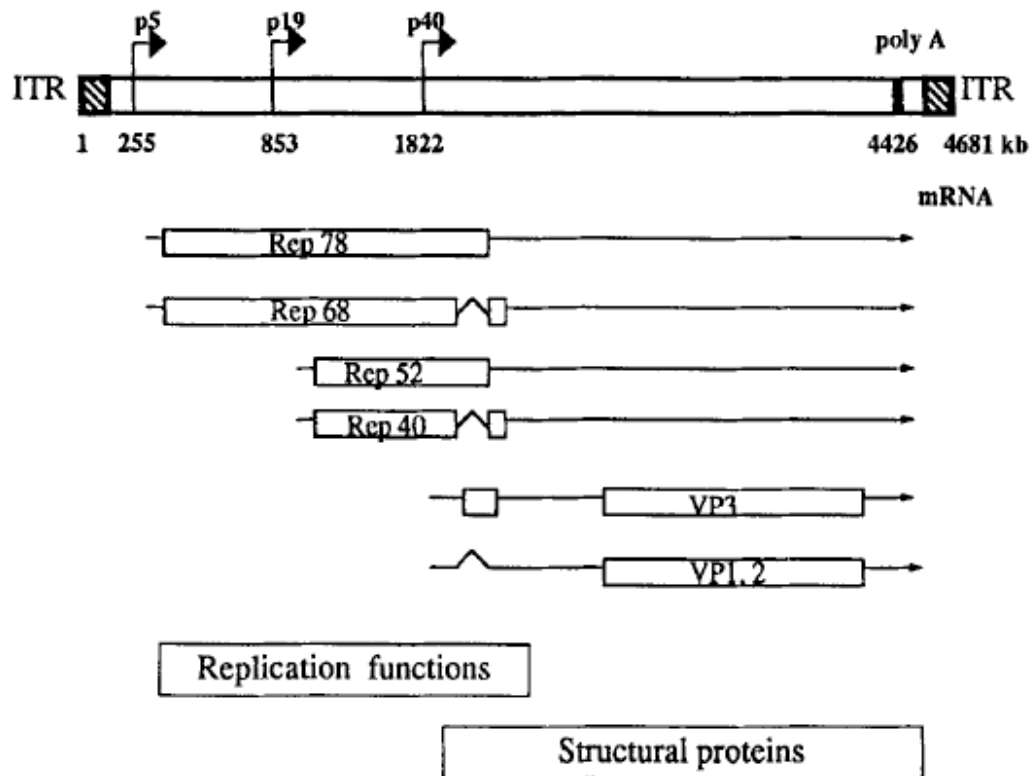


Abbildung 2-4: Schematische Darstellung des AAV-Genoms. Gestreifte Boxen: ITRs; Pfeile markieren den Transkriptionsstartpunkt der Operone; weiße Boxen stehen für die codierenden Regionen. Der linke Open reading frame (ORF) codiert für die Rep-Gene Rep78, Rep 68, Rep 52 und Rep40. Der linke ORF codiert für die Cap-Gene VP1, VP2 und VP3. (aus Rolling et al., 1995 [181]).

2.4.4 Infektionszyklus

Der Infektionszyklus der AAVs besteht aus verschiedenen Teilschritten, läuft jedoch immer nach dem gleichen Schema ab:

1. Bindung an die Zellmembran
2. Endozytose
3. Endosomaler Transport
4. Translokation in den Zellkern
5. Bildung der dsDNA-Form des AAV-Genoms oder Integration ins Wirtsgenom
6. Expression der Rep-Gene
7. Replikation
8. Expression der Cap-Gene, Synthese ssDNA
9. Zusammenbau der Viruspartikel
10. Freisetzung aus Wirtszelle

AAVs können sich nicht selbstständig in den Wirtszellen vermehren, dafür benötigen sie sogenannte Helferviren (z. B. Adenoviren) oder Teile deren DNA. Die AAV Replikation kann durch selektierte Proteine des Adenovirus Genoms sichergestellt werden [182-183].

2.4.5 AAVs in der Gentherapie

AAVs gewinnen in den letzten Jahren ein immer größeres Gewicht, als virale Vektoren in der Gentherapie. Sie besitzen eine Reihe von Eigenschaften, die sie als Genvektoren für die Medizin attraktiv machen.

Ein großer Vorteil liegt in der fehlenden Pathogenität beim Menschen. Vermutlich wird bei einer AAV-Infektion allenfalls eine schwache humorale Immunantwort ausgelöst [184]. Da bei den rekombinanten AAVs auf virale Gene, bzw. deren Genprodukte verzichtet wird, kann eine zelluläre Immunantwort auf virale Antigene geschickt umgangen werden [146].

Eine weitere Eigenschaft der AAVs ist es, dass sie sowohl proliferierende als auch in der S-Phase befindliche Zellen infizieren können und sich, selten spezifisch, in das Genom des Chromosoms 19 integrieren [185] und größtenteils in episomaler Form in den Zellen vorliegen [186]. So erhöht sich deutlich die Effektivität der Infektion und die Bandbreite an möglichen zu infizierenden Geweben und Zelltypen.

Allerdings wurde bei der Entwicklung von AAVs als Genvektoren deren Fähigkeit, sich in das Genom der Wirtszelle zu integrieren, vermindert. Die Fähigkeit intakte Viren zu erzeugen wurde durch Entfernen der virusbildenden Gene verhindert. So wurde das Risiko der unspezifischen Integration in das Wirtsgenom, das sich bei Adenoviren findet, und die Gefahr der Entstehung von sich unkontrolliert

teilenden Zellen reduziert. Das Genom der für die Gentherapie einsetzbaren AAVs bildet in den Nuklei der Wirtszellen episomale Concatamere, deren DNA im Nukleus von den Polymerasen der Wirtszelle transkribiert wird und so ein sicheres und effizientes Expressionssystem darstellen.

Dennoch gibt es einige Nachteile des AAV-vermittelten Gentransfers. Das gesamte AAV-Genom beträgt nur ca. 5kbp und ist somit nicht geeignet sehr große Gene zu transportieren.

Die verzögerte Expression des Transgens ist ein weiterer Punkt. Da es sich bei AAVs um ssDNA-Viren handelt, muss zuerst der komplementäre Strang synthetisiert werden, um dann das Transgen exprimieren zu können.

Da die Transgene bevorzugt in episomaler Form vorliegen, gehen diese bei der Zellteilung verloren, da sie nicht mit repliziert werden können. Bei Geweben, die eine hohe Proliferationsrate aufweisen, ist die Effektivität der Transgenexpression somit stark eingeschränkt. Wiederholte Applikationen der Viren wären demnach nötig, um eine konstante Transgenexpression zu gewährleisten. Daraus ergibt sich der Nachteil einer humoralen Immunabwehr. Obwohl es eigentlich zu keiner erwähnenswerten Immunantwort nach AAV-Infektionen kommt, ist eine verminderte Effizienz der Viren durch humorale Immunreaktionen, nach deren wiederholter Applikation, durch Antikörperbildung denkbar [187]. *In vivo* Studien haben gezeigt, dass eine wiederholte Gabe eines AAV-Vektors zu einer stark verminderten Transgenexpression führt [188].

Trotz ihrer Nachteile bieten AAVs eine sichere und effektive Möglichkeit für den Gentransfer in verschiedenste Gewebe und werden deshalb sicherlich auch in Zukunft eine wichtige Rolle als Vektoren in der Gentherapie spielen.

2.5 Fragestellung und Ziel der Arbeit

Aufgrund der hohen Prävalenz des MetS, wird es immer wichtiger die zu Grunde liegenden pathophysiologischen Mechanismen der Entstehung der verschiedenen Komponenten des MetS, wie DM, Insulinresistenz und Dyslipidämie, aufzuklären, um so neue Ansätze für zukünftige Therapien zu finden.

Zahlreiche *in vitro* und *in vivo* Studien der letzten Jahre belegen, dass Chemerin, ein seit kurzem bekanntes Hepatoadipokin, eine wichtige Rolle im Lipid- und Glukosemetabolismus zu spielen scheint. Klinische Studien haben gezeigt, dass Chemerin mit verschiedenen Parametern des MetS korreliert. Die Aufklärung der Funktionen von Chemerin im Lipid- und Glukosemetabolismus könnte Chemerin als ein neues Ziel für neue Therapieformen, z. B. des DM oder Dyslipidämien, dienen.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die physiologische Rolle von Chemerin in der Pathogenese des MetS und seiner Folgeerkrankungen *in vivo* zu untersuchen. Im Einzelnen sollten die Effekte von Chemerin auf Gewichtszunahme, Glukosestoffwechsel und Insulinresistenz sowie Dyslipidämie und Atherosklerose *in vivo* im Mausmodell untersucht werden.

Hierfür wurde humanes Chemerin in Mäusen mittels eines adeno-assoziierten viralen Vektorsystems überexprimiert. Die Effekte von Chemerin wurden *in vivo* in zwei komplementären Mausmodellen untersucht: in Wildtyp C57BL/6-Mäusen auf Normaldiät (ND) und Hochfettdiät (HFD) und in LDL-Rezeptor Knock Out (LDLR-KO)-Mäusen auf HFD.

Die Frage war, welchen Einfluss Chemerin auf die Gewichtszunahme der Tiere auf einer ND und einer HFD hat. Aus Studien ist bekannt, dass Chemerinspiegel in adipösen Patienten erhöht sind [93] und bei der Differenzierung von Adipozyten eine wichtige Rolle spielt [98, 126]. Chemerin ist im Menschen mit erhöhtem BMI korreliert [93]. Deshalb war die Zielsetzung der Arbeit die Hypothese zu testen, dass eine Expression von Chemerin bei Mäusen unter ND und HFD zu einer vermehrten Gewichtszunahme führt.

Die Mäuse entwickeln diätinduziert nach ca. 10-wöchiger HFD eine Insulinresistenz mit pathologischer Glukosetoleranz, wodurch sie sich zur Untersuchung des Glukosemetabolismus eignen. Chemerin ist beim Menschen mit T2DM mit der Serumglukose und Nüchtern-Seruminsulin assoziiert [88, 90, 93, 125, 139-140]. In verschiedenen Studien konnte gezeigt werden, dass Chemerin die Glukoseaufnahme in Zellen beeinflusst [132, 138]. Ziel war es deshalb die Hypothese zu testen, dass Chemerin mit Serumglukose in den Mausmodellen assoziiert ist.

Im Rahmen der Diät sollte weiterhin untersucht werden, ob Chemerin einen Einfluss auf die Serumlipide der Tiere hat und in diesem Zusammenhang auf die Entstehung von Atherosklerose. Beim

Menschen ist Chemerin mit erhöhten TG und erniedrigten HDL-C assoziiert [93, 98, 139, 189]. Deshalb war das Ziel in komplementären Mausmodellen des HDL- und LDL-Stoffwechsels die Hypothese zu testen, dass Chemerin mit Serumlipiden assoziiert ist.

Eine Studie zeigte, dass beim Menschen atherosklerotische Plaques der Aorta und Koronararterien positiv mit der Chemerinexpression im periaortischen und perikoronaren Fettgewebe korreliert [131]. Da Chemerin beim Menschen auch gleichzeitig mit erhöhten TG korreliert, war es Ziel der Arbeit die Hypothese zu testen, dass die Expression von Chemerin mit der Entstehung von atherosklerotischen Plaques assoziiert ist.

Im Folgenden sollen die Ergebnisse aus den *in vivo* Versuchen dargestellt und diskutiert werden.

3 Material und Methoden

3.1 Verbrauchsmaterialien und verwendete Kits

Materialien	Hersteller	Ort
100bp oder 1kbp DNA-Standard	Invitrogen	Carlsbad, USA
100mM dNTP Set	Invitrogen	Carlsbad, USA
15 und 50 ml Falcons	Techno Plastic Products AG	Trasadingen, CH
20% Glukoselösung	B. Braun	Melsungen, D
20x NUPAGE-Transfer puffer	Invitrogen	Carlsbad, USA
5-Brom-4-chlor-3-indolyl-beta-D-galactopyranosid	Peqlab	Erlangen, D
Acrylamid	Carl Roth	Karlsruhe, D
Agar-Agar	Carl Roth	Karlsruhe, D
Agarose	Saecem	USA
Amicon Ultra centrifugal Filters	Millipore	Billerica, USA
AmpliTaQ Gold® DNA Polymerase with Gene Amp-®	Applied Biosystems	Carlsbad, USA
Ammoniumpersulfat	Merck	Darmstadt, D
Benzonase ultrapure	Roche	Basel, CH
Bradfordreagenz	Biorad	München, D
Bromphenolblau	Merck	Darmstadt, D
BSA	Invitrogen	Carlsbad, USA
Chemerin ELISA	R&D Systems	Wiesbaden, D
Complete Protease Inhibitor Cocktail	Roche	Basel, CH
Contour Sensoren zur Blutzuckerbestimmung	Bayer	Leverkusen, D
CsCL	Merck	Darmstadt, D
Desoxycholsäure (DOC)	Invitrogen	Carlsbad, USA
DMEM/High Glucose (4 g/l)	Gibco	Carlsbad, USA
DMSO	Carl Roth	Karlsruhe, D
DNase I recombinant, RNase frei	Roche	Basel, CH
DNase I, Amplification Grade	Invitrogen	Carlsbad, USA
DTT	Sigma	St. Louis, USA
Duo Set ELISA Chemerin maus und human	R&D Systems	Wiesbaden, D
EDTA-Na2-Salz	Merck	Darmstadt, D
Einbetttschälchen	Polyscience Europe	Eppelheim, D

Einmalkanülen 16G, 20G, 30G	B. Braun	Melsungen, D
Einmal-Küvetten, Plastikbrand®, PMMA	Carl Roth	Karlsruhe, D
Einmalspritzen Injektion 1 ml	Carl Roth	Karlsruhe, D
Essigsäure	Carl Roth	Karlsruhe, D
Ethanol	Carl Roth	Karlsruhe, D
Ethidiumbromid 1%	Carl Roth	Karlsruhe, D
FBS	Biochrom	Berlin, D
Fuji Medical X-Ray Film	Fuji Film	Tokyo, J
Glaskapillaren 100 µl	Fisher Scientific	Schwerte, D
Glutaraldehyde	Carl Roth	Karlsruhe, D
Glycerol	Sigma	St. Louis, USA
HEK-293T-Zellen	Prof. James M. Wilson Gene Therapy Program, University of Pennsylvania	Philadelphia, USA
High Fidelity DNA-Polymerase	Invitrogen	Carlsbad, USA
Histofix 10%	Carl Roth	Karlsruhe, D
Hochfettdiät EF R/M nach TD88137 modifiziert	ssniff	Soest, D
Insulin mouse ultrasensitiv ELISA	Alpco	Salem, USA
Isopropanol	Carl Roth	Karlsruhe, D
Kaliumhexacyanoferrat 3 (K ₃ Fe(CN) ₆)	Carl Roth	Karlsruhe, D
Kaliumhexacyanoferrat 4 (K ₄ Fe(CN) ₆)	Carl Roth	Karlsruhe, D
Kryoröhrchen Nalgene 5 ml	VWR	Bruchsal, D
LB Medium (Lennox)	Carl Roth	Karlsruhe, D
Methanol	Carl Roth	Karlsruhe, D
Milchpulver	Carl Roth	Karlsruhe, D
Minicaps, Na-Hep 100 µl einmal-Mikropipetten	Hirschmann Laborgeräte	Eberstadt, D
Natriumorthovanadat	Sigma	St. Louis, USA
NaCl	Carl Roth	Karlsruhe, D
NaF	Carl Roth	Karlsruhe, D
Normaldiät: EF R/M Kontrolle	ssniff	Soest, D
Normalinsulin human 100 I.E.	Berlin-Chemie AG	Berlin, D
Nucleo Bond Kit (PC 2000 EF)	Machery Nagel	Düren, D
NucleoSpin® Extract II Kit	Machery-Nagel	Düren, D
Objektträger SuperFrost Plus	Thermo Scientific	Dreieich, D
Oil-Red-O	Sigma	St. Louis, USA
PBS	PAA	Pasching, A

PCR-Softtubes 0,5 ml	Biozym	Hessisch Oldendorf, D
PEI	Polysciene Europe	Eppelheim, D
Pen/Strep	PAA	Pasching, A
peqGOLD Protein-Marker V	Peqlab	Erlangen, D
Pipette serologisch, wattiert 1, 2, 5, 10, 25 ml	Corning Incorporated	New York, USA
Pipetten	Eppendorf	Hamburg, D
Pipettenspitzen 10, 200, 1000 µl	Eppendorf	Hamburg, D
Plasmid Mini Kit I	Omega	Norcross, USA
Platinum® Taq-DNA-Polymerase High Fidelity	Invitrogen	Carlsbad, USA
Phenylmethylsulfonylfluorid	Merck	Darmstadt, D
Polyallomer Tubes 13; 38,5 ml	Beckmann Coulter	Krefeld, D
Präparierbesteck	Fine science tools	Heidelberg, D
PVDF Membran	Millipore	Billerica, USA
Qiaquick Gel Extraction Kit	Qiagen	Hilden, D
Reaktionsgefäße 1,5; 2 ml	Eppendorf	Hamburg, D
RNeasy Mini Kit	Qiagen	Hilden, D
Roti-Histokit II	Carl Roth	Karlsruhe, D
ROX Reference Dye	Invitrogen	Carlsbad, USA
Safelock tubes 1,5 ml	Eppendorf	Hamburg, D
Schwefelsäure	Carl Roth	Karlsruhe, D
Sodiumdodecylsulfat	Sigma	St. Louis, USA
β-Mercapthoethanol	Carl Roth	Karlsruhe, D
Stößel 1,5 ml	Carl Roth	Karlsruhe, D
Sudan IV	Sigma	St. Louis, USA
SuperSignal® West Dura Extended Duration Substrate	Thermo Scientific	Dreieich, D
T4-DNA Ligase 100 U	Roche	Basel, CH
Taq DNA-Polymerase, Recombinant	Invitrogen	Carlsbad, USA
TEMED	Carl Roth	Karlsruhe, D
Tissue-Tek	Sakura Fintec	Zoeterwoude, NL
TOPO-TA Cloning Kit	Invitrogen	Carlsbad, USA
T-Per® Tissue Protein Extraktion	Thermo Scientific	Dreieich, D
Tris	Merck	Darmstadt, D
Trypsin/EDTA	PAA	Pasching, A
Tween 20	Carl Roth	Karlsruhe, D
Twin.tec PCR plate 96, skirted	Eppendorf	Hamburg, D

UVette® 220-1600 nm	Eppendorf	Hamburg, D
Zellkulturschalen 10, 15 cm	Techno Plastic Products AG	Trasadingen, CH
Zellschaber	Techno Plastic Products AG	Trasadingen, CH

3.2 Geräte

Geräte	Hersteller	Ort
PCR Sprinter Thermal Cycler	Thermo Scientific	Dreieich, D
Bio-Photometer Plus	Eppendorf	Hamburg, D
Realplex4 Mastercycler	Eppendorf	Hamburg, D
Thermomixer Comfort	Eppendorf	Hamburg, D
Gelgießstand horizontal	CBS Scientific Company	San Diego, USA
Gelgießstand vertikal	BioRad	München, D
PowerPac Basic	Biorad	München, D
Tischzentrifuge Mikro 200R	Hettich Zentrifugen	Tuttlingen, D
X-70 Ultrazentrifuge	Beckmann Coulter	Krefeld, D
Nikon Nis Elements D3.0	Nikon	Düsseldorf, D
Alcyon 300 Analyzer	Abbott	Wiesbaden, D
Curix 60 Entwicklermaschine Kryotom	AGFA	Mortsel, B
Contour Blutzuckermessgerät	Bayer	Leverkusen, D

3.3 Molekularbiologische Methoden

3.3.1 Erstellen von cDNA-Bibliotheken

Um cDNA-Datenbanken herzustellen, wurde die gesamte zelluläre RNA der Zellen extrahiert und mit Hilfe des Enzyms Reverse Transkriptase DNA-Kopien der RNA synthetisiert. Die resultierende cDNA enthielt nur codierende Sequenzen der mRNA der entsprechenden Zellen, und keine genomische DNA, da diese vor der Transkription entfernt wird. Bei allen Arbeiten mit RNA wurden DNase/RNase freie Plastikwaren, Filterspitzen und DEPC-Wasser verwendet, um eine Degradierung der RNA zu vermeiden.

3.3.1.1 RNA-Isolation aus Zellen

Die Isolierung und Reinigung von RNA aus kultivierten Zellen erfolgte mit dem RNeasy Mini Kit der Firma Qiagen entsprechend den Anweisungen des Herstellers. Das Prinzip umfasst die Freisetzung der RNA aus den Zellen unter gleichzeitiger Inaktivierung von RNasen und die Bindung von RNA Molekülen >200 Nukleotiden an eine Silikagel-Membran mit anschließender Reinigung und Konzentrierung der RNA. Adhärente Zellen wurden direkt in den ø 6cm Zellkulturplatten auf Eis lysiert. Hierzu wurden die Zellen nach Entfernung des Zellkulturmediums einmal mit sterilem 1x PBS gewaschen und mit 600 µl Lysepuffer (RLT-Puffer mit 1% β-Mercaptoethanol) pro Well versetzt. Die RNA-Isolierung wurde dann nach RNeasy Protokoll durchgeführt. Die Elution der RNA erfolgte in 50 µl DNase/RNase freiem Wasser.

3.3.1.2 RNA-Isolation aus Gewebe

10-20 mg in Stickstoff gefrorenes Gewebe wurde abgewogen, sofort mit 350 µl Lysepuffer (RLT-Puffer mit 1% β-Mercaptoethanol) versetzt und mit Hilfe von Stößeln in 1,5 ml Reaktionsgefäßen auf Eis mechanisch homogenisiert. Das Homogenisat wurde für 10 min bei 13.000 rpm abzentrifugiert und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die RNA-Isolierung wurde dann nach RNeasy Protokoll durchgeführt. Die Elution der RNA erfolgte in 50 µl DNase/RNase freiem Wasser. Die RNA wurde bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

3.3.1.3 DNase-Verdau

Zur Entfernung von Spuren genomischer DNA wurden alle RNA-Proben einer DNase-Behandlung (Deoxyribonuclease I Amplification Grade, Invitrogen) unterzogen. Bei der Transkription wurden immer gleiche Mengen an RNA, maximal 1 µg, eingesetzt, um bei quantitativen Messungen eine Vergleichbarkeit der Proben untereinander zu gewährleisten.

Reaktionsansatz DNase-Verdau (einfach):

RNA-Probe	X µl
10x DNase I Puffer	1 µl
DNase I (1 U/µl)	1 µl
DEPC-Wasser	Y µl
	Σ 10 µl

Der DNase-Verdau erfolgte über 15 min bei Raumtemperatur (RT) mit anschließender Inaktivierung des Enzyms durch Zugabe von 1 µl EDTA und 10 min Inkubation bei 65°C. Die RNA wurde bei -80°C gelagert.

3.3.1.3.1 Reverse Transkription-PCR (RT-PCR)

Mit der Reversen Transkriptase-PCR kann die aus Zellkultur oder Geweben isolierte RNA in doppelsträngige cDNA umgeschrieben werden. Zur reversen Transkription wurde das SuperScript™ III First Strand Synthesis System von Invitrogen verwendet. Die Reaktionen erfolgten nach Angaben des Herstellerprotokolls in einen PCR Thermocycler (PCR Sprint Thermal Cycler, Thermo Electron Corporation). Zunächst wurden DNase-verdaute RNA, Random Hexamer Primer (50 ng/ml) und dNTP's (10 mM) für 5 min bei 65°C inkubiert. Nach 1 min Abkühlung der Proben auf Eis erfolgte die Zugabe des SuperScript-Mastermix bestehend aus den Komponenten 10x RT Puffer, 25mM MgCl₂, 0,1M DTT, RNaseOut™ und SuperScript™ reverse Transkriptase III (200 U/ml). Nach einer 10 minütigen Annealingphase bei 25°C erfolgte die Synthese der cDNA für 50 min bei 50°C und die Termination anschließend 85°C für 5 min. Die cDNA wurde -20°C gelagert. Eine Kontrolle der reversen Transkription erfolgte über eine anschließende Standard-PCR mit GAPDH Primern.

Reaktionsansatz mit SuperScript Mastermix (einfach):

DNaseI verdaute RNA	8 µl
Random Hexamers (50 ng/ml)	1 µl
dNTP's (10 mM)	1 µl
10x RT Puffer	2 µl
MgCl ₂ (25 mM)	4 µl
DTT (0,1 M)	2 µl
RNaseOUT™ (40 U/ml)	1 µl
SuperScriptIII™ RT (200 U/ml)	1 µl
	Σ 20 µl

3.3.2 RNA und DNA Quantifizierung

Die Konzentrationsmessung der RNA erfolgte photometrisch bei einer Wellenlänge von 260 nm (Bio Photometer plus, Eppendorf). Eine E_{260} mit dem Wert 1 entspricht 40 µg RNA pro Milliliter Probe. Um den Reinheitsgrad der Lösung zu kontrollieren, wurde weiterhin die Extinktion bei 280 nm gemessen. Ein Quotient der Extinktionen (E_{260}/E_{280}) von 1,9-2,1 lässt auf reine RNA schließen. Ein Wert <2,9 deutet auf eine Verunreinigungen mit Protein hin.

Die Bestimmung der DNA-Konzentration erfolgte photometrisch bei einer Wellenlänge von 260 nm (Bio Photometer plus, Eppendorf). Eine E_{260} mit dem Wert 1 entspricht 50 µg doppelsträngiger DNA pro Milliliter Probe. Das Verhältnis zwischen der Messung bei 260 nm und 280 nm ermöglicht eine Abschätzung der Reinheit von Nukleinsäuren. Reine DNA sollte ein E_{260}/E_{280} Verhältnis von 1,8 aufweisen. Verunreinigungen mit Protein reduzieren diesen Richtwert.

3.3.3 PCR-Methoden

Die Polymerase-Kettenreaktion (*eng.*: polymerase chain reaction, PCR) ist eine Methode zur schnellen und gezielten Amplifikation von DNA-Fragmenten. Jede PCR basiert auf drei Schritten: Denaturierung, Hybridisierung und Elongation. Für alle PCR-Arbeiten wurden ausschließlich sterile Pipettenspitzen und Reaktionsgefäße sowie steriles deionisiertes Wasser verwendet. Bei jeder PCR-Technik wurde eine Reagenzienkontrolle (Wasserkontrolle) mitgeführt.

Verwendete PCR-Primer:

Tabelle 3: Verwendete PCR-Primer

Primer	Sequenz
Human Chemerin forward	5'-GAATTCACCGGTACCATGCGACGGCTGCTGATCCC-3'
Human Chemerin reverse	5'-GGCCCTGCCCCGAGCTAAGTCGAGACGT-3'
Mouse GAPDH forward	5'-CCCTTCATTGACCTCAACTA-3'
Mouse GAPDH reverse	5'-AGATCCACGACGGACACATT-3'
Sequenzierprimer MCS forward	5'-GGGGATTGGTGGCGACGACTCC-3'
Sequenzierprimer MCS reverse	5'-GGAGTCGTCGCCACCAATCCCC-3'

3.3.3.1 PCR Amplifikation von DNA

Für PCR-Reaktionen (wie GAPDH) wurde folgender Reaktionsansatz gewählt und entsprechend dem GAPDH- PCR-Programm durchgeführt. Wenn nicht anders vermerkt, wurde die *Taq* DNA Polymerase

(recombinant, 5 U/ μ l) der Firma Invitrogen mit den dazu bereitgestellten Reaktionskomponenten verwendet.

Reaktionsansatz (einfach):

10x PCR-Puffer –MgCl ₂	2,5 μ l
MgCl ₂ (50 mM)	0,75 μ l
dNTP's (10 mM)	0,5 μ l
Primer forward (10 μ M)	1,25 μ l
Primer reverse (10 μ M)	1,25 μ l
Taq-Polymerase (5 U/ μ l)	0,25 μ l
ddH ₂ O	17,5-18 μ l
Template (cDNA)	0,5-1 μ l
	Σ 25 μ l

PCR Programm GAPDH:

94°C	Initiale Denaturierung	3 min
25-30 Zyklen		
94°C	Denaturierung	45 sec
55°C	Annealing	30 sec
72°C	Elongation	1 min 30 sec
72°C		
	Finale Elongation	10 min
4°C		∞

3.3.3.2 Library PCR

Bei dieser PCR-Methode soll gezielt das zu klonierende Gen aus dem cDNA Pool amplifiziert werden, um genügend PCR-Produkt für eine Klonierung zu erhalten. Für die Klonierung von humanem Chemerin, aus humanen Leberkarzinomzellen (HepG2), wurde folgender Reaktionsansatz verwendet:

HepG2 cDNA (500 ng DNA)	8 µl
Primer forward humanes Chemerin (100 pmol)	1 µl
Primer reverse humanes Chemerin (100 pmol)	1 µl
dNTP Mix (10 mM)	1 µl
High Fidelity-DNA- Polymerase (5 U/µl)	0,5 µl
10x HF-DNA-Polymerase Puffer	10 µl
MgCl ₂ (50 mM)	3 µl
H ₂ O	76 µl
	Σ 100 µl

Library-PCR Programm:

95°C	Initiale Denaturierung	2 min
5 Zyklen		
95°C	Denaturierung	30 sec
55°C	Annealing	45 sec
68°C	Elongation	30 sec
30 Zyklen		
95°C	Denaturierung	30 sec
55°C	Annealing	45 sec
68°C	Elongation	30 sec
68°C	Finale Elongation	5 min
20°C		1 min

3.3.3.3 Koloniescreening PCR

Dies ist eine Variante der PCR, in der keine gereinigte DNA als Template eingesetzt wird. Die Methode wurde angewandt, um *E.coli*-Kolonien, welche das Plasmid mit dem gewünschten Insert tragen, zu identifizieren. Hierfür wurde die Kolonie mit einer sterilen Pipettenspitze gepickt, kurz in PCR-Reaktionsmix getaucht und anschließend zum Animpfen einer Luria-Bertani-Medium nach Miller- (LB-) Übernachtskultur verwendet. Für die PCR wurden die Primer aus der jeweiligen Klonierung eingesetzt.

Die Größe der PCR-Produkte wurde im Anschluss an die PCR mittels Agarose-Gelelektrophorese überprüft.

Reaktionsansatz (einfach):

10x PCR-Puffer –MgCl ₂	1,6 µl
MgCl ₂ (50 mM)	0,32 µl
dNTP's (10 mM)	0,16 µl
Primer forward (10 µM)	1 µl
Primer reverse (10 µM)	1 µl
Taq-Polymerase (5 U/µl)	0,08 µl
ddH ₂ O	11,84 µl
	Σ 16 µl

Colony-PCR Programm:

95°C	Initiale Denaturierung	5 min
30 Zyklen		
95°C	Denaturierung	30 sec
55°C	Annealing	30 sec
72°C	Elongation	50 sec
72°C	Finale Elongation	5 min
20°C		5 min

3.3.3.4 Quantitative Real Time-PCR (qRT-PCR)

Die qRT-PCR stellt ein schnelles und vollautomatisiertes Verfahren zur Quantifizierung der mRNA-Expression dar. In einem geschlossenen System werden in einem Schritt Amplifikation, PCR-Produkt-Detektion und -Quantifizierung kombiniert [190-192]. Die Methode erlaubt die direkte Detektion der PCR-Produkt-Akkumulation während der log-linearen Phase der Reaktion über Fluoreszenzfarbstoffe oder fluoreszenzfarbstoffmarkierte Sonden. Diese binden in bestimmten Schritten des PCR-Zyklus an die Ziel-DNA. Das Signal der durch eine Lichtquelle angeregten Fluoreszenzfarbstoffe korreliert dabei quantitativ mit der Menge an PCR-Produkt und kann über eine Software in Echtzeit (real-time) dargestellt werden.

In der vorliegenden Arbeit wurden TaqMan Sonden zur Quantifizierung verwendet. TaqMan-Proben besitzen ein Fluorophor (FAM), das kovalent an das 5'-Ende der Probe gebunden ist und einen Quencher (TAMRA = TAM) am 3'-Ende der Probe. Fluorophor und Quencher sind sich dabei sterisch so nahe, dass keine Fluoreszenz zu messen ist. Die Sonden sind so designt, dass sie in der Mitte des PCR-Produktes binden. TaqMan-Sonden werden durch die 5'-Nukleaseaktivität der DNA-Polymerase hydrolysiert, so dass das Fluorophor nicht länger durch den Quencher unterdrückt wird und die Fluoreszenz frei wird. Die Fluoreszenz wird mit jedem Zyklus proportional zu der Menge an Probe stärker und kann und kann detektiert werden.

Ansatz des 2x TaqMan Mastermix:

AmpliTaQ Gold® (5 U/μl)	50 μl
MgCl ₂ (25 mM)	600 μl
dNTP's (10 mM)	200 μl
10x AmpliTaqGold Puffer	1000 μl
Rox reference Dye	200 μl
DEPC H ₂ O	2950 μl
	Σ 5000 μl

Verwendete Primer für qRT-PCR:

Tabelle 4: Primer und Sonden für qRT-PCR

Primer	Sequenz
Mouse GAPDH forward	5'-GCCTCGTCCCGTAGACAAAA-3'
Mouse GAPDH reverse	5'-TGGCAACAATCTCCACTTTGC-3'
Mouse GAPDH Probe	5'FAM-TTGGCCGTATTGGGCGCCTG-3'TAM
BGH PolyA forward Primer	5'-TCTAGTTGCCAGCCATCTGTTGT-3'
BGH PolyA reverse Primer	5'-TGGGAGTGGCACCTTCCA-3'
BGH PolyA Probe	5'FAM-TCCCCCGTGCCTTCCTTGACC-3'TAM

Verwendete TaqMan-Genexpressionassays von Applied Biosystems:

Tabelle 5: Genexpression-Assays

Primer	Spezifität	Katalognummer
RARRES2	human	Hs00161209_g1
Chemerin-mCpr	murin	Custom Assay
Glucose-6-phosphatase	murin	Mm00839363_m1
Phosphoenolpyruvate carboxykinase 1	murin	Mm00440636_m1

3.3.3.4.1 Virusquantifizierung

Bei der absoluten Quantifizierung wird die absolute Menge der Zielsequenz in einer unbekannten Probe, meist in Kopienzahl pro Reaktion, bestimmt. Dazu werden mehrere Standards mit bekannten Mengen der Zielsequenz in separaten Reaktionen mitgeführt (externe Standards). Als DNA-Standards für die Virusquantifizierung wurde das linearisierte Plasmid verwendet, in den das Zielgene kloniert wurde. Die aufgereinigte AAV-Lösung wurde zuerst einem DNase-Verdau unterzogen, um freie virale DNA zu eliminieren:

Reaktionsansatz DNase-Verdau AAV-Lösung (einfach):

AAV-Lösung	5 µl
10x DNase Puffer	5 µl
DNase (10 U/µl)	2 µl
ddH ₂ O	38 µl
	Σ 50 µl

Die Inkubation erfolgte für 1 h bei 37°C. Die DNase wurde durch 5 minütiges Erhitzen auf 95°C inaktiviert. Für die qRT-PCR wurde die AAV-Lösung in einer 1:100 und 1:1000 Verdünnung gemessen.

Der Standard wurde wie folgt vorbereitet: Das AAV-TBG-MCS Plasmid wurde in einem Verdau mit dem Restriktionsenzym Sall linearisiert. Dann wurde eine Verdünnungsreihe von 1 ng/µl bis 0,001 ng/µl (1 µg AAV-TBG-MCS = $3,84 \cdot 10^{11}$ Genkopien), um eine Standardgerade erstellen zu können.

Für die qRT-PCR wurden die Proben standardmäßig in Doppelbestimmungen im Realplex⁴ Mastercycler (Eppendorf) gemessen.

Reaktionsansatz qRT-PCR (einfach):

BGH PolyA forward Primer (25 pmol)	1 µl
BGH PolyA reverse Primer (25 pmol)	1 µl
BGH PolyA Probe	1 µl
2x TaqMan Mastermix	12,5 µl
Standard oder linearisierte Probe	1 µl
ddH ₂ O	8,5
	Σ 25 µl

Standard PCR Programm Virusquantifizierung:

50°C	2 min
95°C	10 min
40 Zyklen	
95°C	15 sec
60°C	1 min

Die Quantifizierung der AAV-Partikel erfolgte anhand der erstellten Standardgeraden.

3.3.3.4.2 Genexpression

Zur Bestimmung der relativen Genexpression wurde die $\Delta\Delta\text{CT}$ -Methode [193] gewählt. Diese Methode vergleicht die Ct-Werte des zu untersuchenden Gens einer Probe mit einem Kontrollgen, z. B. ein Housekeeping-Gen wie GAPDH. Der Ct-Wert gibt an, in welchem Zyklus der PCR die DNA-Menge für das jeweilige Gen oberhalb des *thresholds* detektierbar war. Die Messung erfolgte im Realplex⁴ Mastercycler (Eppendorf).

Reaktionsansatz mit eigenen qRT-PCR Primern (einfach):

forward Primer (25 pmol)	1 µl
reverse Primer (25 pmol)	1 µl
Probe	1 µl
2x TaqMan Mastermix	12,5 µl
Standard oder linearisierte Probe	1 µl
ddH ₂ O	8,5
	Σ 25 µl

Reaktionsansatz mit Genexpressionassays (einfach):

Genexpressionassay	1,25 µl
2x TaqMan Mastermix	12,5 µl
cDNA Probe	1 µl
H ₂ O	8,5
	Σ 25 µl

3.4 DNA Sequenzierung

Alle Sequenzierungen wurden von der Firma MWG-Eurofins, München durchgeführt. Als Sequenzierprimer wurden entweder die Standardprimer der Firma MWG oder der MCS-Sequenzierprimer (Tabelle 3) verwendet.

3.5 Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese ist eine einfache Methode zur Analyse von PCR Reaktionen, Konzentrationsabschätzung der DNA, zur präparativen Reinigung von DNA-Fragmenten und zur Überprüfung von Restriktionsverdaus. Bei der Elektrophorese werden die negativ geladenen Nukleinsäuren entlang eines elektrischen Gradienten in einer Polymermatrix (Agarose) nach Molekülgröße aufgetrennt. Wenn nicht anders vermerkt, wurden 0,7 - 1,5%ige Agarosegele in Abhängigkeit der Größe zu untersuchenden Fragmente verwendet. Für die Herstellung der Gele wurde Agarose durch Aufkochen in 1x Tris-Acetat-EDTA (TAE)-Puffer (40 mM TRIS, 1 mM EDTA-Na₂-Salz, 40 mM Essigsäure, pH 8,5) gelöst und nach Abkühlung mit 0,5 µg/ml Ethidiumbromid (1%) versetzt. Die DNA-Proben, mit 6x Ladepuffer (0,25% Bromphenolblau, 30% Glycerol) angesetzt, wurden zusammen mit 100 bp oder 1 kbp DNA-Größenstandard (Invitrogen) auf das erstarrte Gel aufgetragen und mit 1x TAE als Laufpuffer bei 120 V elektrophoretisch aufgetrennt. Unter UV-Beleuchtung konnten die DNA-

Fragmente sichtbar gemacht und mittels eines Dokumentationssystems (MultiDoc Digital System Imaging System, UVP) und der dazugehörigen Software Doc It 2 4.0 analysiert werden.

3.5.1 Reinigung von DNA aus Agarosegelen

Um linearisierte Plasmide, DNA-Fragmente oder PCR-Produkte zu reinigen, wurden diese in präparativen Agarosegelen der Größe nach aufgetrennt. Die zu isolierenden DNA-Banden wurden unter UV-Belichtung mit einem Skalpell aus dem Gel herausgeschnitten und in ein Reaktionsgefäß überführt. Nach dem Auflösen des Gelstückes erfolgte die Aufreinigung der DNA mittels Silikagel Säulen aus dem NucleoSpin® Extract II Kit von Machery-Nagel laut Angaben des Herstellers. Die Elution wurde in 30 µl durchgeführt, die DNA bei -20°C gelagert.

3.5.2 Reinigung von DNA nach „enzymatischen Reaktionen“

Nach dem Restriktionsverdau wurden enzymatische Reaktionen mit Hilfe des Qiaquick Gel Extraction Kits (Qiagen) für die weiteren enzymatischen Reaktionen laut Angaben des Herstellers aufgereinigt. Die Elution erfolgte in 30 µl.

3.6 Klonierung von Chemerin

3.6.1 Restriktionsverdau

In der vorliegenden Arbeit wurde die Restriktion zur Klonierung und für analytische Verdäue eingesetzt. Nach einer Klonierung wurden die Virusvektoren neben der Sequenzanalyse über verschiedene Restriktionsmuster auf das eingebrachte Insert und die Richtigkeit der mutationsanfälligen ITR's geprüft. Eine Restriktionskontrolle der Helferplasmide (deltaF6 und Cap8) erfolgte nach jeder Plasmid-DNA-Präparation mit dem Restriktionsenzym SmaI, welcher für das jeweilige Plasmid ein spezifisches Bandenmuster nach Agarosegelelektrophorese ergab. Die Restriktionen wurden mit den Enzymen der Firma New England Biolabs nach Herstellerangaben und mit den gelieferten Puffern und BSA-Lösungen durchgeführt. Generell wurde 1 µg DNA mit bis zu 20 U Enzym in 50 µl Endvolumen für mindestens 2 h verdaut. Reaktionsbedingungen (Temperatur, Puffer und BSA-Konzentration) wurden an das jeweilige Enzym angepasst. Die mRNA Sequenz für die Konstruktion der Klonierungsprimer wurde aus der Pubmed-Datenbank entnommen (Accession NM_002889).

3.6.2 Klonierung von Chemerin

Nach der Durchführung der Chemerin Library PCR wurde das PCR Produkt (ca. 500 bp) wie oben beschrieben über eine Agarosegelelektrophorese aufgereinigt. Das gereinigte PCR Produkt wurde über einen Zwischenschritt in den TOPO-TA Vektor (Invitrogen) nach Angaben des Herstellers kloniert. Positive Kolonien wurden gepickt und das Vorhandensein des Inserts (human Chemerin) durch eine Koloniescreening PCR bestätigt.

2 µg des verwendeten Expressionsplasmids AAV-TBG-MCS2 wurden mit den Restriktionsenzymen AgeI und SalI (BioLabs) geschnitten. Nach dem Verdau wurde der Vektor über eine Silicasäule aufgereinigt, um die Restriktionsenzyme vollständig zu entfernen. Das Transgen wurde aus dem TOPO-TA Vektor-Transgen Konstrukt mit den Restriktionsenzymen AgeI und XhoI (BioLabs) herausgeschnitten und das Fragment über ein Agarosegel isoliert.

Der Restriktionsverdau erfolgt in einem Ansatz, in dem das Enzym in einem 10fachen Überschuss vorliegt. Das Volumen des Ansatzes betrug 50 µl. Der erste Verdau erfolgt mit AgeI bei 37°C für 2 h. Danach wurden die Produkte über eine Qiagen Gel-Extraction Säule aufgereinigt, um den Ansatz vollständig vom Restriktionsenzym und dem Puffer zu befreien. Der zweite Verdau erfolgte mit XhoI bzw. SalI bei 37°C für XhoI und RT für SalI für 2 h. Die Enzyme wurden für 20 min bei 65°C hitzeinaktiviert. Anschließend wurde das mit AgeI und XhoI geschnittene Transgen und der mit AgeI und SalI geschnittene Vektor über die Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt. Die Vektorbande liegt bei 500 bp. Die entsprechende Bande des Vektors (ca. 4500 bp) wurde mit einem Skalpell aus dem Agarosegel ausgeschnitten und die DNA mit dem DNA-Gelextraction Kit (Qiagen) eluiert. Es folgte die Ligation von Vektor und Transgen.

Reaktionsansatz für Restriktionsverdau (allgemein):

Zu verdauende DNA	x µl
Enzym	1 µl
10x Enzym Puffer	2 µl
10x BSA	2 µl
ddH ₂ O	y µl
	Σ 20 µl

3.6.3 Ligation

Der mit Restriktionsenzymen verdaute Vektor und das ebenfalls verdaute Transgen wurden durch die T4-Ligase (Roche) ligiert. Die Inkubation erfolgte für 1-2 h bei RT. Danach wurde das Plasmid in kompetente Bakterien transformiert.

Ansatz Ligation (einfach):

Vektor AgeI, Sall	1 µl
Transgen AgeI, XhoI	3 µl
10x Ligase Puffer	3 µl
T4-Ligase (100 U)	1 µl
ddH ₂ O	22 µl
	Σ 30 µl

3.7 Mikrobiologische Methoden

3.7.1 Transformation kompetenter E.coli

3.7.1.1 Transformation DH5α

Die Transformation der kompetenten Zellen (DH5α, Invitrogen) erfolgte mittels Hitzeschock. Dabei wurden 50 µl Bakteriensuspension auf Eis aufgetaut und mit x µl/ng (1-10 ng DNA) gereinigtem Plasmid/Ligationsprodukt versetzt. Nach 30 min Inkubation auf Eis erfolgte der Hitzeschock bei 42°C für 20 Sekunden, bei dem die Plasmid DNA von E.coli aufgenommen wird. Anschließend wurden die Zellen für 2 min auf Eis abgekühlt und nach Zugabe von 900 µl vorgewärmten S.O.C. Medium bei 37°C unter leichtem Schütteln (225 rpm) 60 min inkubiert. Die Bakterien wurden anschließend für 1 min bei 6000 rpm zentrifugiert, das Pellet in 200 µl S.O.C. Medium resuspendiert und die Suspension mittels Drygalski-Spatel auf Selektionsplatten mit entsprechendem Antibiotikum ausplattiert. Im Fall einer einfachen Transformation zur Plasmidvermehrung wurde die Zellsuspension 1:10-1:100 mit S.O.C. Medium verdünnt und zu 100 µl auf die Selektionsplatte gebracht.

3.7.1.2 Transformation Stb12

Die Transformation von Plasmiden >10 kb (wie dem Helferplasmid ΔF6) erfolgte in MAX Efficiency® Stb12™ kompetenten Zellen (Invitrogen). Stb12™ *E.coli* zeichnen sich durch eine hohe Transformationseffizienz (>10⁹ cfu/µg) aus. Der Ablauf der Transformation entspricht dem für die DH5α

Zellen. Unterschiedlich durchgeführt wurde der Hitzeschock. Dieser erfolgte bei den Stb12™ *E.coli* bei 42°C für 25 sec. Im Anschluss erfolgte die Inkuabtion wie bei den DH5α Zellen bei 37°C für 1 h und 225 rpm.

3.7.2 Plasmidpräparation aus *E.coli*

Protokolle für die Plasmid-DNA Isolierung aus Bakterienkulturen basieren auf einer modifizierten alkalischen Lyse. Chromosomale bakterielle DNA und Plasmid DNA denaturieren infolge des alkalischen Milieus. Durch Zugabe von Kaliumacetat präzipitiert die chromosomale DNA und kann von der Plasmid-DNA abgetrennt werden. Eine Aufreinigung der Plasmid-DNA erfolgt anschließend mittels Anionentauscher-Säulen. Die Präparation kleiner Plasmid-DNA Mengen für Sequenzierung, Klonierung oder Restriktionsverdau wurde mit dem Plasmid Mini Kit I der Firma Omega durchgeführt. Für die Isolierung wurden 1-2 ml einer frischen Übernachtskultur bei 6000 rpm für 10 min zentrifugiert und das Bakterienpellet anschließend nach Angaben des Herstellers weiter verarbeitet. Die Eluierung erfolgte mit vorgegebenem Elutionspuffer oder sterilem deionisierten Wasser. Zur Präparation größerer Mengen Endotoxin freier Plasmid-DNA für die Transfektion wurde das NucleoBond Kit (PC 2000 EF) der Firma Machery-Nagel verwendet. Die Pelletierung der Bakterien aus 500 ml LB Selektionsmedium erfolgte bei 6000 g und 4°C für 15 min. Entsprechend dem Protokoll des Herstellers wurde die Isolierung durchgeführt und die Präparation abschließend in 1 ml Endotoxin freiem TE-Puffer resuspendiert.

3.8 Proteinchemische Methoden

3.8.1 Immunoblotting

Die Methode des Western-Blots ermöglicht es, spezifische Proteine in komplexen Proteingemischen nachzuweisen. Dafür werden die Proteine nach Proteinpräparation durch die Gelelektrophorese in einem elektrischen Feld der Größe nach aufgetrennt, im Verfahren des Western-Blottings auf eine Trägermembran übertragen und gleichzeitig immobilisiert, um auf dieser mittels spezifischer Antikörper identifiziert werden zu können. Ein erster Antikörper bindet an das gesuchte Protein, ein Sekundärantikörper, an den z. B. ein Enzym gebunden ist, detektiert daraufhin den ersten.

3.8.2 Proteinpräparation aus Geweben

10-20 mg gefrorenes Gewebe wurde in 300 µl T-Per® Tissue Protein Extraction Reagent (Pierce) mit Protease/Phosphatase-Inhibitoren (1x Complete (Roche), PMSF 1 mM, Na₃VOP₄ 1 mM und NaF 1 mM) in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß auf Eis homogenisiert. Das Homogenisat wurde 15 min auf Eis inkubiert

und dabei gelegentlich invertiert. Anschließend wurde das Homogenisat bei 4°C, 6000 rpm für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und eine Proteinmengenbestimmung durchgeführt. Die Proteinlysate wurden bei -80°C gelagert.

3.8.3 Proteinmengenbestimmung nach Bradford

Die Proteinbestimmung wurde nach Bradford (1976) mit Hilfe des Bio-Rad DC Protein Assay durchgeführt. Über eine Bindung der Proteine an das saure Coomassie Brilliant Blue G-Reagenz kommt es zu einer proportionalen Veränderung des Absorptionsmaximums von 465 nm in Richtung 595 nm, je nach Proteingehalt. Dadurch wird eine optische Farbveränderung sichtbar, deren Entstehung durch die Stabilisierung der anionischen Form des Farbstoffes durch die hydrophoben und ionischen Interaktionen der Proteine bedingt ist.

Durchführung

Jeweils 2 µl der lysierten Proben wurde mit 1:5 mit H₂O verdünnter Bioradlösung versetzt, einer Stammlösung bestehend aus dem Coomassie Brilliant Blue Farbstoff, Ethanol und Phosphorsäure. Nach 10-minütiger Inkubation bei RT erfolgte die photometrische Messung bei 595 nm in Einmalküvetten gegen eine proteinfreie Kontrolle mit sonst gleicher Zusammensetzung. Die Proteinkonzentration bemisst sich nach der Zunahme der Absorption bei 595 nm. Berechnet wurde die Proteinkonzentration in den Proben mit Hilfe einer Standardgeraden von 0-25 µg/ml BSA.

Für die Immunoblot Analyse wurden jeweils 30 µg der Proben mit 5 µl 6x SDS-Probenpuffer und x µl HO₂ ad 25 µl gemischt und die Proteine durch 5-minütiges Erhitzen auf 95 °C denaturiert.

Zusammensetzung 6x SDS-Probenpuffer:	12% SDS
	60% Glycerol
	600 mM DTT
	60 mM Tris pH 6,8
	0,06% Bromphenolblau
	in H ₂ O

3.8.4 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Die Proteine können über SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese ihrer relativen Molekülmasse nach aufgetrennt werden. SDS (Sodiumdodecylsulfat) ist ein Detergens, das sich an Proteine anlagert, diese denaturiert und Komplexe mit konstantem Ladungs- zu Massenverhältnis bildet. Die Laufgeschwindigkeit der Proteine im Gel vom Minus- zum Pluspol ist nun nur noch von ihrer relativen

Molekülmasse abhängig. Die Wahl der Acrylamidkonzentration und somit der Porengröße des Trenngels richtet sich nach der Masse des gesuchten Proteins.

Puffer und Lösungen:

Trenngel (10%):	H ₂ O	3,41 ml
	3 M Tris-HCl pH 8,8	4,68 ml
	30% Acryl-bisacrylamid	4,1 ml
	10% SDS	0,125 ml
	10% Ammonium Persulfat	0,1 ml
	TEMED	0,01 ml
Sammelgel (4%):	H ₂ O	3,46 ml
	3 M Tris-HCl pH 8,8	0,625 ml
	30% Acryl-bisacrylamid	0,83 ml
	10% SDS	0,05 ml
	10% Ammonium Persulfat	0,025 ml
	TEMED	0,05 ml
Laufpuffer:	Tris	3,02 g
	Glycin	14,42 g
	10% SDS	10 ml
	pH 8,3	
	H ₂ O	ad 1 l

Durchführung

Für die Herstellung eines 10 cm breiten Gels wurde ein 10%iges Trenngel in die 13 cm breite Kammer des Bio-Rad Mini-Protean® 3 Systems gegossen. Alle weiteren Angaben beziehen sich auf dieses System. Zum Glätten der Oberfläche wurde das Trenngel hierauf mit 0,5 cm Isopropanol überschichtet und nach einstündiger Polymerisation abgegossen. Die Kammer wurde mit dem Sammelgel angefüllt, in welches ein Kamm zur Bildung von Geldaschen eingesetzt wurde. Nach 30 min konnte der Kamm entfernt, das Gel in die mit Laufpuffer angefüllte Elektrophoreseeinheit eingebaut und die Taschen mit je 25 µl der Probenansätze befüllt werden. In einer Tasche wurde ein Proteingrößenstandard (peq GOLD Protein Marker V) als Kontrolle der Bandentrennung mitgeführt. In Relation zu diesem Größenstandard konnte später die Molekularmassenbestimmung der gesuchten Proteine erfolgen. Mittels eines Spannungsgerätes (PowerPac Basic, Biorad) wurde eine Spannung von 95 V an die mit Laufpuffer aufgefüllte Gelelektrophoresekammer angelegt. Die Stromstärke wurde während der Wanderung der

Banden von 10 mA im Sammelgel auf 20 mA für die Auftrennung erhöht. Die Elektrophorese wurde beendet, sobald die Lauffront am Ende des Gels angekommen war. Das Gel wurde auf die PVDF-Membran und zwischen zwei mit Transferpuffer (NuPAGE Transfer buffer, Invitrogen) getränkte Whatman-Papers gelegt und dann bei einer Spannung von 25 V für 1 h geblottet. Anschließend wurde die PVDF-Membran in 5% Milchpulver gelöst in 1x TBST-Lösung 1 h lang inkubiert, um die unspezifischen Bindungsstellen der Antikörper zu blockieren. Die Inkubation mit dem 1. Antikörper (AK) erfolgte über Nacht, bei 4°C auf dem Schüttler. Anschließend wurde die Membran 3x 5 min mit 1x TBST, gewaschen und dann für 1 h mit dem 2.AK unter schütteln bei RT inkubiert. Nach der Inkubation wurde die Membran 3x 5 min mit 1x TBST gewaschen.

1x TBST Waschpuffer:	Tris	50 mM
	NaCl	150 mM
	Tween 20	1%
	pH 7,5	
	in H ₂ O	

Tabelle 6: Verwendete Antikörper für Western-Blot-Analyse

Antikörper	Herkunft	Firma	Verdünnung
Anti-Actin	rabbit	Sigma Aldrich	1:2000
Phospho-Akt (Thr308)	rabbit	Cell Signaling	1:1000
Akt1 (C73H10)	rabbit	Cell Signaling	1:1000
Phospho-AMPKα (Thr172)	rabbit	Cell Signaling	1:1000
AMPKα (23A3)	rabbit	Cell Signaling	1:1000
Anti-human Chemerin	goat	R&D Systems	1:1000
α-goat HRP-gekoppelt	rabbit	Jackson ImmunoResearch	1:10.000
α-rabbit HRP-gekoppelt	goat	Cell Signaling	1:10.000

3.8.4.1 Detektion

Die Konjugation des Zweitantikörpers mit HRP ermöglichte die im Folgenden beschriebene Detektion mit dem SuperSignal® West Dura Extended Duration Substrate (Thermo Scientific). Die Luminol/Enhancer Lösung und die Peroxid Lösung des Systems wurden im Verhältnis 1:1 gemischt. Die Membran wurde mit dieser Mischung 1 min lang inkubiert und danach in Folie verpackt. Die katalytische Aktivität der an den Zweitantikörper gekoppelten Peroxidase überführte das Luminol in seine oxidierte, leuchtende Form. Die dadurch entstandenen Banden wurden durch Auflegen eines photosensitiven

Films (SuperRX Medical X-Ray Film, Fujifilm, Tokyo, Japan) für 1-10 min der Dunkelkammer detektiert. Die Film Entwicklung erfolgte mit Agfa Curix 60 Filmentwickler.

3.8.4.2 Stripping

Die PVDF-Membran kann mehrmals hintereinander mit verschiedenen Antikörpern inkubiert werden. Beim Strippen kann durch Entfernung gebundener Antikörper von der Membran und erneutes Blocken eine bereits entwickelte Membran für eine weitere Antikörperreaktion wiederverwendet werden. Die PVDF-Membran wurde zur Entfernung von Antikörpern mit Stripping-Lösung 1 30 min bei RT unter schütteln inkubiert, anschließend für weitere 10 min mit Stripping-Lösung 2. Die Membran wurde dann wieder geblockt und mit neuen Antikörpern inkubiert.

Stripping-Lösung 1:	Glycin	0,9 g	
	10% SDS		50 ml
	pH 2 mit HCl einstellen		
	H ₂ O		ad 500 ml
Stripping-Lösung 2:	NaCl		4,59 g
	H ₂ O		ad 500 ml

3.8.5 ELISA

ELISA ist die Abkürzung für enzyme-linked immuno sorbent assay. Hierbei macht man sich die Eigenschaft spezifischer Antikörper zu Nutze, die an den nachzuweisenden Stoff (Antigen) binden. Antikörper oder Antigen werden zuvor mit einem Enzym markiert. Die durch das Enzym katalysierte Reaktion dient als Nachweis für das Vorhandensein des Antigens. Das Substrat wird vom Enzym umgesetzt, das Reaktionsprodukt kann üblicherweise durch Farbumschlag, Fluoreszenz oder Chemolumineszenz nachgewiesen werden. Die Signalstärke ist im Allgemeinen eine Funktion der Antigenkonzentration, so dass ELISA auch für quantitative Nachweise verwendet werden kann.

3.8.5.1 Sandwich ELISA

Eine der ELISA-Techniken (Sandwich-ELISA) verwendet zwei Antikörper (AK), die beide spezifisch an das nachzuweisende Antigen binden, wobei das Antigen zwischen den beiden AK gebunden ist

(Sandwich). Für den Nachweis von humanem und murinem Chemerin wurde ein DuoSet ELISA Kit der Firma R&D Systems nach Angaben des Herstellers verwendet.

Es ist es wichtig, dass die Antikörper an unterschiedlichen Stellen an das Antigen binden, da sie sich sonst gegenseitig behindern würden. Der Capture-Antikörper (4 µg/ml; 100 µl/Well) wurde an eine feste Phase (96-Well-Mikrotiterplatte) gebunden. 100 µl der Probe (1:200 verdünnt) mit dem nachzuweisenden Antigen wurden dann in die Wells gegeben und über Nacht bei RT inkubiert. Während dieser Zeit bindet der an die Platte gebundene Antikörper das in der Probe vorhandene Antigen. Nach Ablauf der Inkubationsphase wurde die Platte gewaschen. Die ungebundenen Bestandteile der Probe werden dadurch entfernt und zurück bleibt nur das am Capture-Antikörper gebundene Antigen. Im nächsten Schritt wurde ein biotinylierter Detektions-Antikörper (1 µg/ml) zugegeben, der ein anderes Epitop als der Capture-Antikörper erkennt. Dieser zweite Antikörper bindet ebenfalls an das Antigen und es entsteht der Antikörper-Antigen-Antikörper-Komplex. Durch erneutes Waschen der Platte wurde der überschüssige Antikörper ausgewaschen. Erst jetzt kann das Antigen detektiert und quantifiziert werden. Es wurde eine Streptavidin-HRP Lösung zugegeben und für 20 min bei RT im Dunkeln inkubiert. Es entsteht durch enzymatische Reaktion ein Farbkomplex, die durch Zugabe von 2N Schwefelsäure gestoppt wurde. Für quantitative Nachweise wurde eine Standardgerade mit bekannter Chemerinkonzentration erstellt. Die Extinktion wurde mit einem Photometer bei 450 nm gemessen und die Konzentration anhand der Standardgeraden ermittelt.

Insulin wurde mit dem Insulin (mouse) Ultrasensitive EIA Kit von Alpco nach Angaben des Herstellers gemessen. Das Prinzip des ELISAs war das gleiche wie bei den Chemerin ELISAs, allerdings war hier der Detektions-Antikörper mit HRP (Horseredishperoxidase) konjugiert. Das Substrat für die enzymatische Farbreaktion war TMB (Tetramethylbenzidin). Die Extinktion wurde bei 450 nm gemessen und anhand der erstellten Standardgeraden quantifiziert.

3.9 Zellbiologische Methoden

3.9.1 Zellkultur

3.9.1.1 Zelllinie

Für die Produktion des Adeno-assoziierten Virus wurde die Zelllinie HEK-293T verwendet. HEK steht für „Human Embryonic Kidney“. Es handelt sich um adhärenente Zellen. Sie wurden Ende der 1970er Jahre als Transformationsprodukt einer menschlichen embryonalen Nierenzelle mit DNA-Teilen des menschlichen Adenovirus 5 geschaffen. Da HEK-Zellen, durch die ursprüngliche Transformation mit einem Adenovirus, bestimmte Adenovirus-Gene exprimieren, werden sie auch zur Vermehrung von Adenoviren verwendet. HEK-293T-Zellen exprimiert zusätzlich das "SV40 large T-Antigen", welches die

DNA-Replikation von episomalen Plasmiden mit dem "SV40 origin of replication" ermöglicht. Somit lassen sich bestimmte Retroviren, wie beispielsweise Lentiviren, oder auch DNA-Viren in 293T-Zellen vermehren.

3.9.1.2 Kultivierung

Die Inkubation der Zellen erfolgte in einem auf 37°C temperiertem Brutschrank, bei 95% relativer Luftfeuchtigkeit sowie 5% CO₂ Konzentration. Zur Kultivierung der Zellen wurde DMEM High Glucose (4 g/ml) + 10% FBS + 1% Penizillin/Streptomycin verwendet.

3.9.1.3 Passagieren der HEK-293T Zellen

Die Zellen wurden in Zellkulturplatten (9 15 cm) kultiviert. Alle 3-4 Tage wurden die Zellen gesplittet. Dazu wurden die Zellen mit 10 ml 1x PBS gewaschen. Das PBS wurde vollständig entfernt und 2 ml 1x EDTA/Trypsin (PAA) zugegeben. Die Zellen wurden für 5 min bei 37°C inkubiert, bis sich die adhärenenten Zellen vollständig gelöst hatten. Dann wurde 8 ml frisches Medium zugegeben und die Zellen durch mehrmaliges auf und ab pipettieren resuspendiert. 1-2 ml der Zellsuspension wurde auf neue Zellkulturplatten gegeben und 10 ml frisches Medium hinzugefügt.

3.9.2 Produktion der AAVs

3.9.2.1 Transfektion von HEK-293T Zellen mit Polyethylenimid (PEI)

Einen Tag vor der Transfektion wurden die zu 95% konfluenten Zellen 1:2 gesplittet. Hierfür wurden 25 Platten (9 15 cm) auf 50 Platten gesplittet. Am nächsten Tag waren die Zellen zu 80-90% konfluent und konnten transfiziert werden. Die Zellen wurden hierfür für 2 h in 19 ml/Platte DMEM High Glucose Medium + 1% Pen/Strep, ohne FBS inkubiert.

Für die Produktion der AAV wurde eine sogenannte Triple-Transfektionsmethode gewählt, d. h. transfiziert wurden das Plasmid mit dem Transgen (humanes Chemerin), ein Plasmid mit der Sequenz für das Kapsid 8 (Cap 8) und ein Helferplasmid (Δ F6), welches die Assemblierung des Virus in der Wirtszelle ermöglicht. Die Transfektion erfolgte mit PEI (1 µg/µl in 1x PBS, pH 4-5). PEI kondensiert die Plasmide in positive geladene DNA Komplexe, die leicht in die Wirtszelle eindringen können. Die Plasmide und das PEI wurden in 10 ml serumfreien Medium gemischt und gut gevortext. Dann wurde der Mix für 15 min bei RT inkubiert. In dieser Zeit bilden sich die Plasmid-DNA-Komplexe.

Ansatz Transfektionsmix (für 10 Platten):

Helferplasmid $\Delta F6$	260 μg
Cap 8	130 μg
Plasmid mit Transgen	130 μg
PEI (1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$)	1040 μg
Serumfreies DMEM Medium	10 ml

Nach der Inkubation wurden 1,1 ml des Transfektionsmixes auf eine Platte gegeben und durch leichtes Bewegen der Platte darauf verteilt. Dann wurden die Zellen für 4 h bei 37°C, 5% CO₂ inkubiert. Anschließend wurde auf die Platten 5 ml Medium + 50% FBS + 1% Pen/Strep gegeben.

Die Zellen wurden für weitere 24 h bei 37° inkubiert. Dann erfolgte ein Mediumwechsel. Die Zellen erhielten wieder ihr Kultivierungsmedium. Die Zellen wurden für weitere 72 h inkubiert und anschließend abgeerntet und die Viren aus den Zellen aufgereinigt.

3.9.2.1.1 Virusaufreinigung mit Cäsiumchloridgradient

Die abgeernteten Zellen wurden bei 4°C für 15 min bei 4000 rpm abzentrifugiert. Das Pellet wurde einmal mit 1x PBS im 50 ml Falcon gewaschen. Dann wurde das 1x PBS entfernt und das Zellpellet bis zur weiteren Aufreinigung bei -80°C eingefroren.

Verwendete Lösungen: (alle Lösungen wurden steril filtriert!)

TMN-Puffer:	1 M Tris-HCL (ph 7,4)	20 ml
	1 M MgCl ₂	1 ml
	5 M NaCl	30 ml
	ddH ₂ O	ad 1 l
10% Desoxycholsäure:	DOC	10 g
	ddH ₂ O	ad 100 ml
1,41 g/ml CsCl:	CsCl	128,47 g
	ddH ₂ O	196,53 ml
	Refraktionsindex messen	1,3733
1,61 g/ml CsCl:	CsCl	168 g
	ddH ₂ O	156,975 ml
	wiegen um Dichte zu kontrollieren	

Das gefrorene Zellpellet wurde bei 37°C für 10 min im Wasserbad aufgetaut. Das Pellet wurde dann in 27 ml TMN-Puffer resuspendiert und anschließend auf Eis gestellt. Die Suspension wurde 3x 30 sec bei 30% Output auf Eis sonifiziert, um extrazelluläre Nukleinsäuren zu zerstören. Zu der Zellsuspension wurden 3,5 µl Benzonase (Sigma 250 U/µl) vorsichtig zugegeben und das Tube invertiert. Die Suspension wurde für 20 min auf Eis inkubiert und zwischendurch immer wieder vorsichtig invertiert. Benzonase ist eine Endonuklease, die sowohl DNA als auch RNA verdaut. Die Zugabe zur Zellsuspension bewirkt, dass alle zellulären Nukleinsäuren zerstört werden und nur die Viren intakt bleiben. Nach der Inkubation erfolgte die Zugabe von 1,25 ml 10% DOC. Das Tube wurde vorsichtig invertiert und für 10-20 min auf Eis inkubiert. DOC lysiert die Zellen, so dass der Virus freigesetzt werden kann. Nach der Inkubation wird die Suspension für 15 min bei 4°C und 4000 rpm zentrifugiert. Der Überstand, der nun den Virus enthält, wurde in ein neues Tube überführt.

Zu dem Überstand wurden 0,454 g CsCL pro ml Probe gegeben und alles durch invertieren gut gemischt. Dann wurde der CsCL-Gradient vorbereitet. Hierfür wurden SW-28 Tubes (Beckmann) zuerst mit 9 ml 1,41 g/ml CsCl befüllt und anschließend mit 9 ml 1,61 g/ml CsCl unterschichtet. Pro Gradient wurden 17-18 ml des Virusüberstandes gegeben ohne dabei den Gradienten zu zerstören. Es folgte eine Ultrazentrifugation bei 25000 rpm bei 15°C für 20 h.

Am nächsten Tag wurde der Gradient fraktioniert. Von oben wurde jeweils 1 ml des Gradienten vorsichtig ohne die Schichten zu zerstören abgenommen und in bereitgestellte 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt. Danach wurde der Refraktationsindex mit einem Refraktometer gemessen. Der Refraktationsindex (RI) beschreibt den Grad der Lichtbrechung, wenn das Licht auf ein mehr oder weniger transparentes Material trifft, hier also den Virus in der Probe. Der RI für AAV sollte im RI-Bereich 1,362-1,373 liegen. Die Fraktionen, die im Sollbereich lagen, wurden mit einer 10 ml Spritze mit 18G Kanüle vereint und zu gleichen Teilen in zwei 70 Ti quick seal Tubes (Beckmann) gegeben. Die Tubes wurden mit 1,41 g/ml CsCl luftblasenfrei aufgefüllt und dann zugeschweißt. Es folgte eine Ultrazentrifugation bei 60000 rpm, 15°C für 24 h.

Am nächsten Tag wurde der Gradient erneut fraktioniert. Von oben wurden jeweils 1 ml des Gradienten vorsichtig ohne die Schichten zu zerstören abgenommen und in bereitgestellte 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt. Danach wurde der RI mit einem der einzelnen Proben gemessen. Der AAV sollte im RI-Bereich 1,362-1,373 liegen. Die Fraktionen, die im Sollbereich lagen, wurden mit einer 10 ml Spritze mit 18G Kanüle vereint und zu gleichen Teilen in zwei 70 Ti quick seal Tubes (Beckmann) gegeben. Die Tubes wurden mit 1,41 g/ml CsCl luftblasenfrei aufgefüllt und dann zugeschweißt. Es folgte eine Ultrazentrifugation bei 60000 rpm, 15°C für 24 h.

Am nächsten Tag wurde der Gradient wieder fraktioniert. Von oben wurden jeweils 0,5 ml des Gradienten vorsichtig ohne die Schichten zu zerstören abgenommen und in bereitgestellte 1,5 ml

Reaktionsgefäße überführt. Danach wurde der Refraktionsindex mit einem Refraktometer gemessen. Der AAV sollte nun im RI-Bereich 1,364-1,371 liegen. Die Fraktionen, die im Sollbereich lagen, wurden mit einer 10 ml Spritze mit 18G Kanüle vereint und zu gleichen Teilen in zwei 70 Ti quick seal Tubes (Beckmann) gegeben.

Zum Schluss wurde der Virus noch aufgereinigt und konzentriert. Auf einen Millipore UltraFree 100K Centrifugal Filter (Millipore) wurden 10 ml steriles 1x PBS gegeben und anschließend die vereinten Fraktionen hinzugefügt. Die Zentrifugation erfolgte bei 3000 rpm für 5 min bei RT. Insgesamt wurde der Filter 2x mit 12 ml 1x PBS gewaschen, wobei die Flüssigkeit auf dem Filter nie weniger als 2 ml betragen sollte. Der konzentrierte AAV wurde in ein 4 ml Kryoröhrchen (Nalgene) überführt, der Filter noch viermal mit 100 µl 1x PBS durch auf- und abpipettieren gewaschen um restliche Viruspartikel vom Filter zu lösen. Das Virus wurde bis zur weiteren Verwendung bei 4°C gelagert.

3.10 *In vivo* Studien

3.10.1 Tierstudien

Für die Studien wurden 4-5 Wochen alte männliche C57BL/6 Wildtyp (n=7/Gruppe) und B6.12957-LDLr^{tm1Her/J} (LDLR-KO, n=12/Gruppe) Mäuse (Charles River Laboratories, Sulzfeld, Deutschland) verwendet. Nach Ankunft wurden die Mäuse zuerst für eine Woche unter Standardbedingungen gehalten, damit sich die Tiere akklimatisieren konnten. Die Tiere wurden nach Gewicht und Gesamtcholesterin paarweise zugeordnet und über Schwanzveneninjektion mit 1×10^{13} Partikeln AAV.Chemerin oder AAV.LacZ injiziert.

3.10.1.1 Versuchsablauf C57BL/6 Wildtypmäuse

Nach der Injektion mit 1×10^{13} Partikeln AAV.Chemerin oder AAV.LacZ wurden die Tiere (n=7/Gruppe) zunächst für 8 Wochen auf ND gesetzt. Ab Woche 9 erhielten die Tiere für 13 Wochen eine HFD (0,21% Cholesterol, 21% Butterfett; ssniff, Soest, Deutschland). Das Gewicht der Tiere wurde wöchentlich kontrolliert. Alle vier Wochen erfolgte eine retroorbitale Blutentnahme und die Messung der Serumlipide (Gesamtcholesterin, TG, HDL-C) durch enzymatische Messung mit dem Alcyon 300 Analyzer (Abbott GmbH, Wiesbaden, Deutschland) und den kommerziellen Reagenzien von Diasys (Holzheim, Deutschland). LDL wurde automatisch nach Freidewaldformel ($LDL = -(TG/5 + HDL - TC)$) berechnet. Nach zehn Wochen auf HFD erfolgte ein ipGTT. Am Ende des Versuchs wurden die Tiere (n=3/Gruppe) ip mit 0,02 U Insulin/g Körpergewicht oder 0,9% NaCl injiziert, um die Aktivierung von Akt1 und AMPK-α untersuchen zu können. 15 min nach der Injektion wurden die Tiere getötet und die Organe (Leber, gonadales Fett und Musculus soleus) sofort in flüssigem Stickstoff tiefgefroren und bis zur weiteren

Analyse bei -80°C aufbewahrt. Für eine detaillierte schematische Abbildung des Versuchsablaufs siehe Abbildung 4-1.

3.10.1.2 Versuchsablauf LDLR-KO Mäusen

Nach der Injektion mit 1×10^{13} Partikeln AAV.Chemerin oder AAV.LacZ wurden die Tiere (n=12/Gruppe) für 16 Wochen auf eine HFD (0,21% Cholesterol, 21% Butterfett; ssniff, Soest, Deutschland) gesetzt. Das Gewicht der Tiere wurde wöchentlich kontrolliert. Alle vier Wochen erfolgte eine retroorbitale Blutentnahme und die Messung der Serumlipide (Gesamtcholesterin, TG, HDL-C) durch enzymatische Messung mit dem Alcyon 300 Analyzer (Abbott GmbH, Wiesbaden, Deutschland) und den kommerziellen Reagenzien von Diasys (Holzheim, Deutschland). Nach 12 Wochen auf HFD erfolgte ein ipGTT und nach 14 Wochen auf HFD wurde ein ipITT durchgeführt. Am Ende des Versuchs wurden die Tiere (n=6/Gruppe) ip mit 0,02 U Insulin/g Körpergewicht oder 0,9% NaCl injiziert, um die Aktivierung von Akt1 und AMPK- α untersuchen zu können. 15 min nach der Injektion wurden die Tiere getötet und die Organe (Leber, gonadales Fett und Skelettmuskel (Musculus soleus)) sofort in flüssigem Stickstoff tiefgefroren und bis zur weiteren Analyse bei -80°C aufbewahrt. Die Aorten der Tiere wurden präpariert und die atherosklerotischen Plaques mittels Sudan IV Färbung angefärbt und das Ausmaß der Plaquefläche bestimmt. Für eine detaillierte schematische Abbildung des Versuchsablaufs siehe Abbildung 4-11.

3.10.2 Intra peritonealer Glukosetoleranztest (ipGTT)

Um die Glukosetoleranz der Mäuse zu testen, wurden die Mäuse für 12 h, bei freiem Zugang zu Wasser, gefastet. Dann wurde die Nüchtern-Blutglukose der Mäuse gemessen. Hierfür wurde die Schwanzspitze der Tiere mit einem Skalpell angeritzt, der erste Blutstropfen verworfen und die Blutglukose aus dem Kapillarblut mit dem Contour Blutzuckermessgerät (Bayer) bestimmt. Dann erfolgte die ip Glukoseinjektion. 20%ige Glukoselösung wurde steril filtriert und auf 37°C erwärmt. Den Tieren wurde 2 g Glukose/kg Körpergewicht injiziert. Zu den Zeitpunkten 15, 30, 60 und 120 min nach Glukoseinjektion wurde bei allen Tieren jeweils die Blutglukosewerte bestimmt. Zu den Zeitpunkten 0 und 30 min wurde zusätzlich etwas Blut zur Bestimmung der Insulinspiegel mittels ELISA-Analyse abgenommen. Hierfür wurden Minicaps, Na-Hep 100 μ l einmal-Mikropipetten (Hirschmann Laborgeräte), verwendet.

3.10.3 Intra peritonealer Insulintoleranztest (ipITT)

Die Mäuse wurden für 12 h, bei freiem Zugang zu Wasser, gefastet. Dann wurde die Nüchternblutglukose der Mäuse gemessen. Hierfür wurde die Schwanzspitze der Tiere mit einem

Skalpell angeritzt, der erste Blutstropfen verworfen und die Blutglukose aus dem Kapillarblut mit dem Contour Blutzuckermessgerät (Bayer) bestimmt. Dann erfolgte die ip Insulininjektion. Den Tieren wurde 0,5 U Insulin (Normalinsulin human 100 I.E., Berlin-Chemie AG) pro kg Körpergewicht injiziert. Zu den Zeitpunkten 15, 30, 60 und 120 min nach Glukoseinjektion wurde bei allen Tieren jeweils die Blutglukosewerte bestimmt.

3.11 Histologische Methoden

3.11.1 LacZ-Färbung von Gefrierschnitten

Puffer und Lösungen

20x KC	Kaliumhexacyanoferrat 3 ($K_3Fe(CN)_6$)	0,82 g
	Kaliumhexacyanoferrat 4 ($K_4Fe(CN)_6$)	1,05 g
	In 25 ml PBS lösen	

40x X-Gal solution (5-Brom-4-chlor-3-indolyl-beta-D-galactopyranosid)

40 mg/ml in Dimethylformamid

X-Gal Staining solution	PBS	50 ml
	20x KC	2,5 ml
	40x X-Gal	1,25 ml

Nach Beendigung des Versuchs wurden Teile der Leber in TissueTek eingebettet und auf Trockeneis eingefroren. Mit einem Kryotom wurden die Gefrierblöcke in 5 µm dicke Schnitte geschnitten und die Schnitte auf Objektträger aufgenommen. Die Objektträger hat man abtropfen lassen und die Schnitte für 1 h bei RT in 0,5% Glutaraldehyd/PBS inkubiert. Danach wurden die Schnitte über Nacht bei 37°C in X-Gal Staining Lösung inkubiert. Die Zellkerne wurden mit 0,5% Eosin-Lösung gegengefärbt. Die Schnitte wurden nach waschen mit 1x PBS mit Roti-Histokit II eingedeckt, um sie haltbar zu machen.

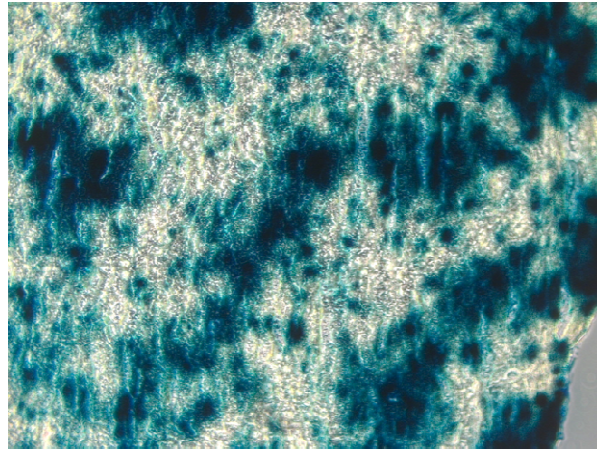


Abbildung 3-1 Lac-Z Färbung eines Leber-Gefrierschnitts. Die blau gefärbten Zellen zeigen AAV infizierte Zellen, die das LacZ-Transgen exprimieren.

3.11.2 Aortenfärbung und Quantifizierung

Um die atherosklerotischen Plaques in der Gesamtaorta zu quantifizieren, wurde die Aorta vom Aortenbogen bis zur Bifurkation freipräpariert. Die aufgeschnittene Aorta wurde für 24 h in 4% Histofix-Lösung fixiert und dann unter dem Mikroskop von Geweberesten gesäubert. Die Aorta wurde auf der gesamten Länge aufgeschnitten und für 40 min bei 37°C in 400 µl Sudan 4-Lösung (5 mg/ml in 70% Isopropanol) inkubiert. Anschließend wurde die gefärbte Aorta in 400 µl 70% Isopropanol überführt, das Reaktionsgefäß kurz geschüttelt und dann für weitere 40 min bei 37°C inkubiert, um überschüssige Färbelösung wieder auszuwaschen. Nach dem Entfärben sind nur noch die atherosklerotischen Plaques rotgefärbt. Anschließend wurde die Aorta in die 4% Histofix-Lösung zurückgegeben.

Die Aorten wurden auf eine dunkle Wachsplatte befestigt. Mit einer Kamera (Nikon, Düsseldorf) wurden die Aorten dokumentiert. Der Anteil der atherosklerotischen Plaques/Gesamtaorta wurde mit Hilfe des Nikon Nis Elements D3.0 (Nikon, Düsseldorf) ermittelt. Das Ergebnis wurde in Prozent der Plaquesfläche zur Oberfläche der Gesamtaorta berechnet.

4 Ergebnisse

4.1 Effekte von humanem Chemerin auf die Regulation von Glukose- und Lipidstoffwechsel in C57BL/6 Mäusen

Um den Effekt von Chemerin auf Körpergewicht, Glukose- und Lipidmetabolismus *in vivo* zu untersuchen, wurde in einem ersten Experiment in Wildtyp-C57BL/6 Mäusen humanes Chemerin (Chemerin) mit Hilfe eines adeno-assoziierten viralen Vektorsystems überexprimiert. C57BL/6 Mäuse entwickeln nach ca. 10-wöchiger HFD eine Insulinresistenz mit pathologischer Glukosetoleranz und stellen ein klassisches Mausmodell zur Untersuchung des Glukosemetabolismus und des HDL-Cholesterinstoffwechsels dar [194-198].

Für das Experiment wurden die Tiere in zwei Gruppen à 7 Tiere, paarweise nach Gewicht und Gesamtcholesterin zugeordnet. Gruppe 1 wurde 1×10^{13} AAV.Chemerin Partikel und Gruppe 2 1×10^{13} Partikel AAV.LacZ über die Schwanzvene injiziert. Die ersten 8 Wochen erhielten die Tiere eine ND, in Woche 9 erfolgte der Wechsel auf eine Cholesterin-reiche HFD für weitere 13 Wochen. Der Versuchsablauf ist in Abbildung 4-1 schematisch dargestellt.

Als interne Kontrolle für eine Infektion der Leberzellen mit AAA-Viren wurden Gefrierschnitte der mit AAV.LacZ injizierten Tiere angefertigt, um die Expression von LacZ histologisch, mittels einer LacZ-Färbung, nachzuweisen. Die Expression des LacZ-Transgens war in der Leber der Tiere gleichmäßig verteilt (Abbildung 3-1). Im weiteren Verlauf wurde auf diese Kontrolle nicht weiter Bezug genommen.

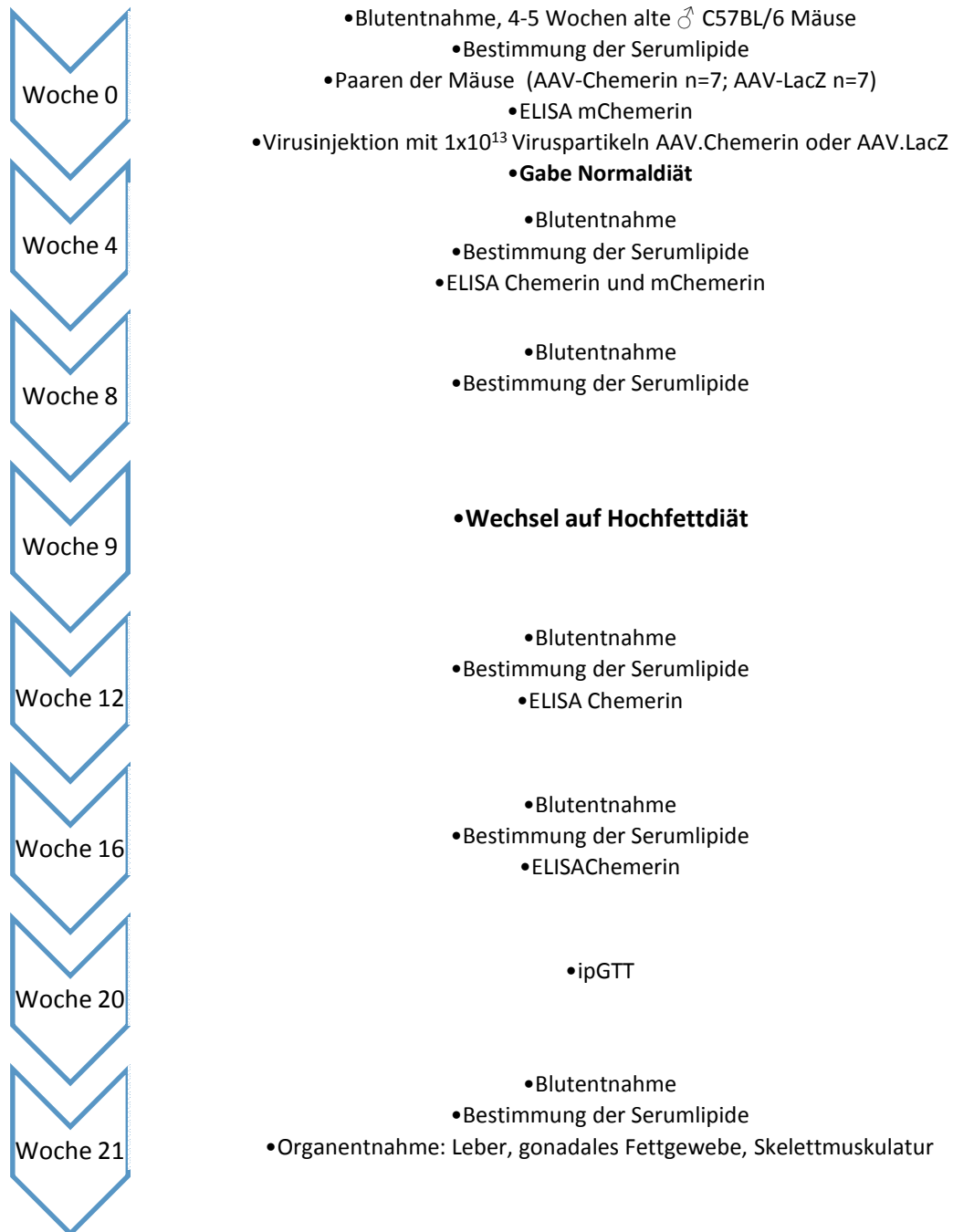


Abbildung 4-1: Schematische Darstellung des Versuchsablauf für C57BL/6 Mäuse.

4.1.1 Nachweis der AAV-vermittelten humanen Chemerin Expression in C57BL/6 Mäusen

4.1.1.1 Nachweis der Chemerin mRNA-Expression in C57BL/6 Mäusen

Nach Beendigung des Versuchs in Woche 21 wurden die Mäuse getötet und aus Leber sowie Skelettmuskel (Musculus Soleus) RNA isoliert, um so die Expression von Chemerin auf mRNA-Ebene mittels quantitativer RT-PCR (qRT-PCR) zu bestimmen.

Die Injektion von AAV.Chemerin führte zu einer leberspezifische mRNA-Expression von humanem Chemerin (Abbildung 4-2 a).

Zur Kontrolle der gewebespezifischen Expression von Chemerin wurde die mRNA-Expression von humanem Chemerin zusätzlich im gonadalen Fettgewebe gemessen. Hier konnte keine signifikante Expression des humanen Chemerin gezeigt werden (Abbildung 4-2 b).

Um auszuschließen, dass die AAV-vermittelte mRNA-Expression von humanem Chemerin die physiologische Expression des murinen Chemerin beeinflusst, wurde in der Leber die mRNA-Expression von murinem Chemerin (mChemerin) gemessen. Es zeigte sich keine Veränderung der mChemerin mRNA-Expression nach AAV.Chemerin-Injektion in der Leber der Tiere (Abbildung 4-2 c).

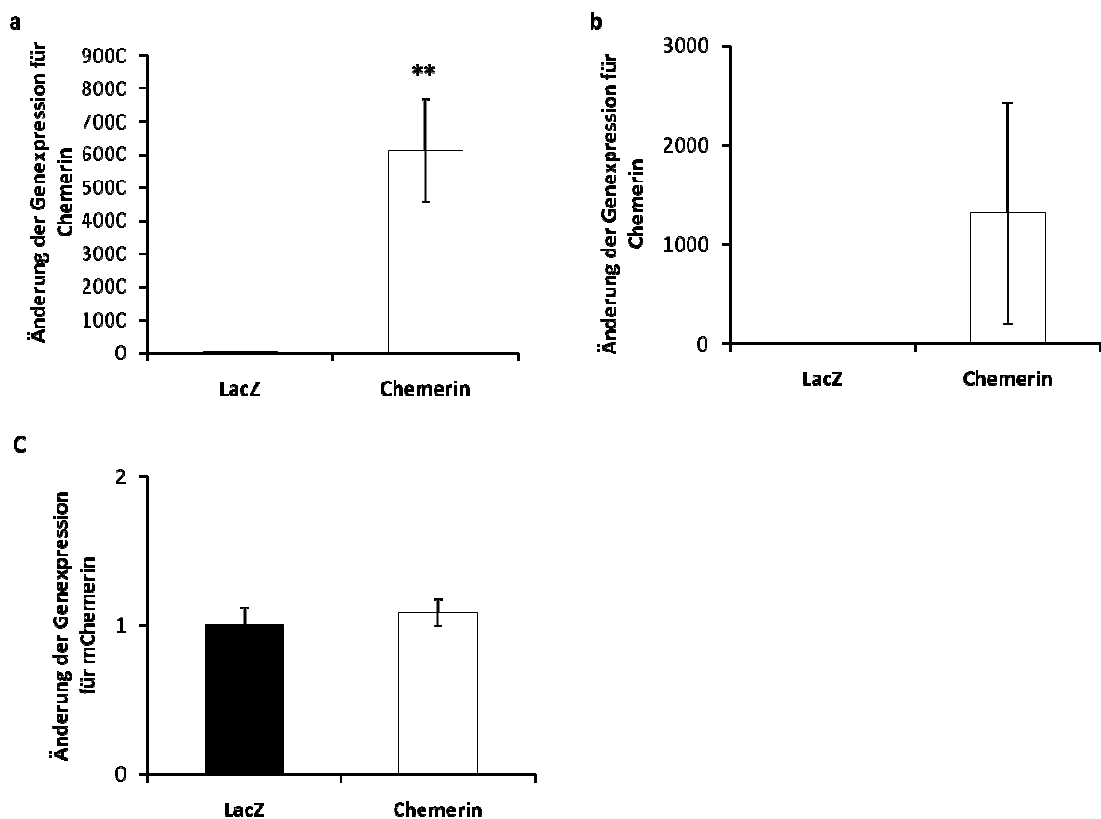


Abbildung 4-2: mRNA-Expression von humanem Chemerin (Chemerin) in C57BL/6 Mäusen injiziert mit 1×10^{13} AAV.LacZ- oder AAV.Chemerin-Partikeln (n=7/Gruppe). Leber (a), gonadales Fettgewebe (b). Expression von mChemerin mRNA in der Leber von (c) C57BL/6 Mäusen injiziert mit 1×10^{13} AAV.LacZ- oder AAV.Chemerin-Partikeln (n=7/Gruppe). **p<0,01

4.1.1.2 Nachweis von Chemerin im Serum von C57BL/6 Mäusen

Mit einer Western-Blot-Analyse konnte humanes Chemerin als sezerniertes Protein im Serum der Mäuse nachgewiesen werden (Abbildung 4-3). Der verwendete Antikörper erkennt spezifisch nur humanes Chemerin, wobei keine Unterscheidung zwischen aktivem und inaktivem Chemerin erfolgte. Wie deutlich zu sehen ist, konnte Chemerin nur in der mit AAV.Chemerin injizierten Gruppe nachgewiesen werden. In der LacZ-Gruppe erfolgt keine Detektion des Proteins (Abbildung 4-3). Als Kontrolle wurde das Serum eines gesunden Probanden mitgeführt.

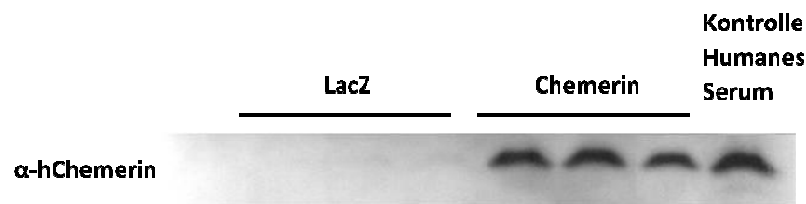


Abbildung 4-3: Western-Blot-Analyse der humanen Chemerinexpression im Serum von 3 repräsentativen C57BL/6 Mäusen, injiziert mit 1×10^{13} Partikeln AAV.LacZ oder AAV.Chemerin. Kontroll-Serum eines gesunden Probanden.

Der Nachweis von humanem Chemerin im Serum der Mäuse erfolgte zu verschiedenen Zeitpunkten vor, sowie 4, 8, 12, 16 und 21 Wochen nach Virusinjektion mittels eines ELISA-Tests. Zu jedem Zeitpunkt wurden Positivkontrollen von gesunden Probanden mitgeführt, die gleichzeitig als interne Kontrolle dienten.

Die Expression von Chemerin zeigte einen zeitabhängigen Verlauf und erreichte nach 16 Wochen einen maximalen Serum-Chemerinspiegel (Chemerin-exprimierende Gruppe $180,4 \pm 8,44$ ng/ml, Kontrollgruppe 0 ng/ml), der der physiologischen Serum-Chemerinkonzentration gesunder Probanden entspricht (Abbildung 4-4 a und b). Nach 21 Wochen fällt der Serum-Chemerinspiegel etwa auf die Hälfte des in Woche 16 gemessenen Spiegels ab (Abbildung 4-4 c).

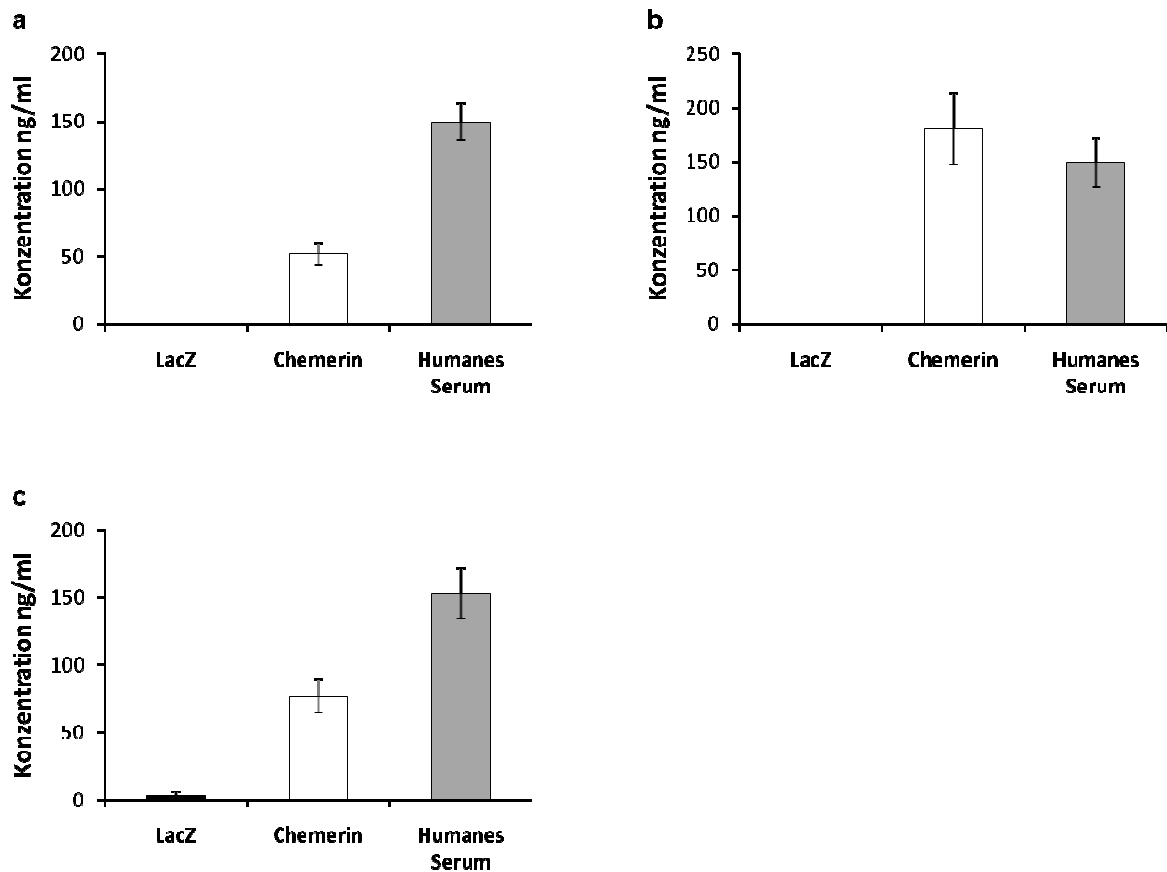


Abbildung 4-4: Konzentration von Chemerin (ng/ml) im Serum 4 Wochen (a), 16 Wochen (b) und 21 Wochen nach der Injektion von C57BL/6 Mäusen mit 1×10^{13} Partikeln AAV.LacZ- oder AAV.Chemerin ($n=7$ /Gruppe). Als Referenz wurde Serum von gesunden Probanden ($n=3$) verwendet.

Um zu untersuchen, ob die AAV-induzierte Expression von Chemerin Einfluss auf murine Serum-Chemerinspiegel hatte, wurde ein ELISA-Test spezifisch für mChemerin durchgeführt. Die Konzentration wurde in den 4-5 Wochen alten Tieren vor der Virusinjektion (Abbildung 4-5 a), sowie 4 Wochen nach Virusinjektion im Serum der Tiere gemessen. Die murinen Serum-Chemerinspiegel in den 4-5 Wochen alten Tieren waren vor der Injektion des AVVs in den paarweise zugeordneten Gruppen nicht signifikant unterschiedlich (Chemerin-exprimierende Gruppe 90 ± 14 ng/ml, Kontrollgruppe $94,53 \pm 12,48$ ng/ml, $p=ns$). Die Expression von humanem Chemerin hatte nach 4 Wochen keinen Einfluss auf murine Serum-Chemerinspiegel in beiden Gruppen (Abbildung 4-5 b) (Chemerin-exprimierende Gruppe $77,67 \pm 2,95$ ng/ml, Kontrollgruppe $88 \pm 8,57$ ng/ml, $p=ns$).

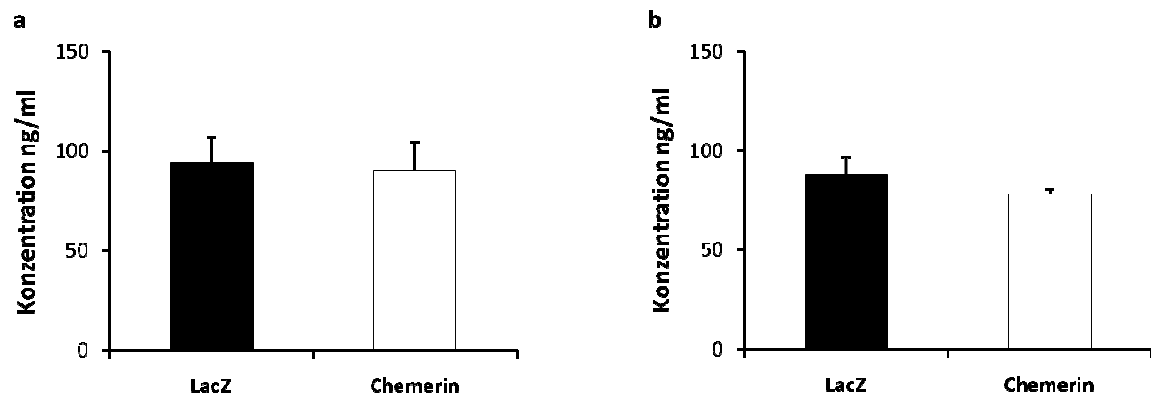


Abbildung 4-5: Expression von mChemerin im Serum von C57BL/6 Mäusen im Alter von 4-5 Wochen ($n=5$ /Gruppe) vor Virusinjektion (a) und 4 Wochen nach Injektion mit 1×10^{13} Partikeln AAV.LacZ oder AAV.Chemerin (b).

4.1.2 Effekt von Chemerin auf das Körpergewicht von C57BL/6 Mäusen

Aus bisherigen epidemiologischen Studien ist bekannt, dass die Serum-Chemerinspiegel mit dem Körpergewicht korrelieren [88, 93, 97, 128, 139]. Deshalb wurde während des gesamten Versuchs wöchentlich das Körpergewicht der Tiere kontrolliert, um so einen möglichen Effekt von Chemerin auf das Körpergewicht der Mäuse unter ND oder HFD festzustellen.

Im Verlauf über 20 Wochen zeigte sich zwischen den Chemerin-exprimierenden Mäusen und den Kontrollmäusen (Abbildung 4-6) weder unter ND (Woche 1-8) noch unter HFD (Woche 9-21) ein Unterschied in der Gewichtszunahme

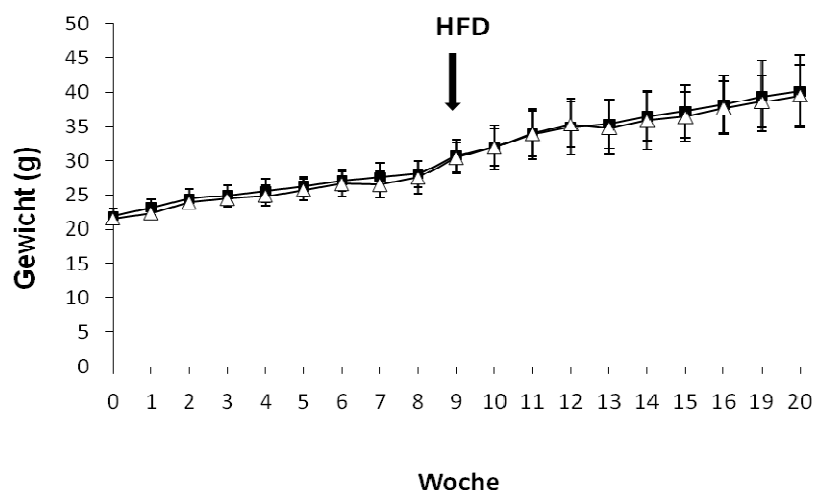


Abbildung 4-6: Gewichtsverlauf C57BL/6 Mäuse injiziert mit 1×10^{13} Partikeln AAV.LacZ-(schwarze Quadrate) oder AAV.Chemerin-(weiße Dreiecke) ($n=7$ /Gruppe) über 21 Wochen. Woche 1-8: ND; Woche 9-21 HFD.

4.1.3 Effekt von Chemerin auf den Glukosestoffwechsel von C57BL/6 Mäusen

In verschiedenen Studien konnte bisher gezeigt werden, dass Chemerin sowohl *in vitro* als auch *in vivo* den Glukosemetabolismus beeinflusst. *In vitro* wurde eine durch Chemerin vermittelte Insulinresistenz in Adipozyten [128] gefunden.

In vivo verursacht die akute Gabe von Chemerin eine verminderte Glukoseaufnahme in verschiedenen Geweben und erniedrigte Insulinspiegel im Serum von Mäusen [129].

Um zu testen, ob Chemerin *in vivo* eine Insulinresistenz verursacht, wurde bei den C57BL/6 Mäusen (n=7/Gruppe) nach 10 Wochen auf HFD ein intraperitonealer Glukosetoleranztest (ipGTT) durchgeführt. Während in den ersten 15 min nach intraperitonealer Glukoseinjektion ein vergleichbarer Blutzuckeranstieg der beiden Gruppen zu sehen war, zeigten die Chemerin-exprimierenden Tiere im weiteren Verlauf 30-120 min nach Glukoseinjektion tendenziell höhere Blutzuckerwerte als die Kontrolltiere (Abbildung 4-7 a).

Um zu sehen, ob die tendenziell höheren Blutzuckerwerte der Chemerin-exprimierenden Tiere durch eine verminderte Insulinsekretion verursacht wurden, wurden vor Glukoseinjektion und nach 30 min die Insulinwerte gemessen. Die Insulinspiegel der beiden Gruppen waren nach Glukoseinjektion nicht signifikant unterschiedlich (Abbildung 4-7 b).

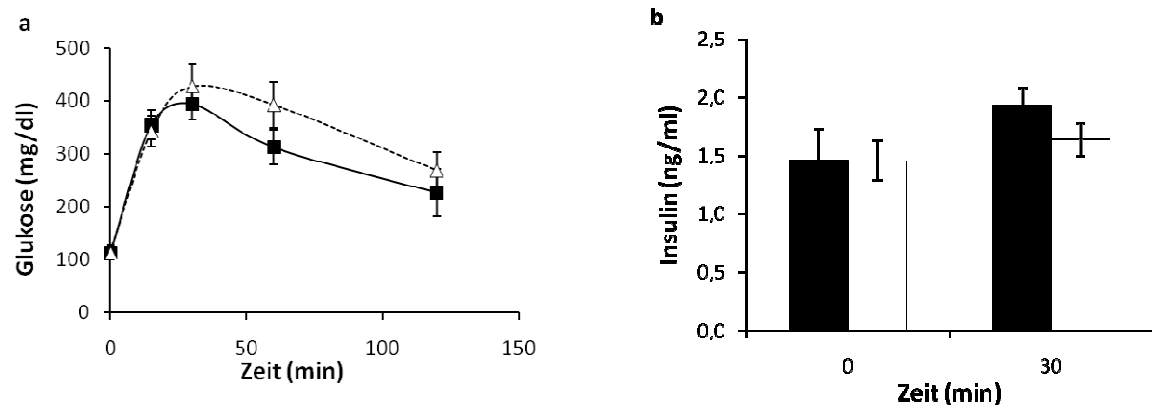


Abbildung 4-7: Effekt von Chemerin auf Glukose- (a) und Insulinspiegel (b) während des ipGTTs in C57BL/6 Mäusen nach 10 Wochen auf HFD und 20 Wochen nach der Injektion mit 1×10^{13} Partikeln AAV.LacZ (schwarz) oder AAV.Chemerin (weiß) (n=7/Gruppe).

Um eine Aussage darüber zu treffen, ob den tendenziell erhöhten Blutzuckerwerten in der Chemerin-exprimierenden Gruppe der C57BL/6 Mäusen eine gewebespezifische Insulinresistenz zugrunde lag, wurden mittels Immunoblotting-Analyse der Insulinsignalweg und die Aktivierung von AMPK α in Leber, Skelettmuskulatur und gonadalem Fettgewebe untersucht (Abbildung 4-8).

Die Chemerin-exprimierenden Tiere und die Kontrolltiere zeigten keinen Unterschied in der durch Insulin vermittelten Phosphorylierung von Akt1 und der Phosphorylierung von AMPK α in Leber, Skelettmuskulatur und gonadalem Fettgewebe (Abbildung 4-8).

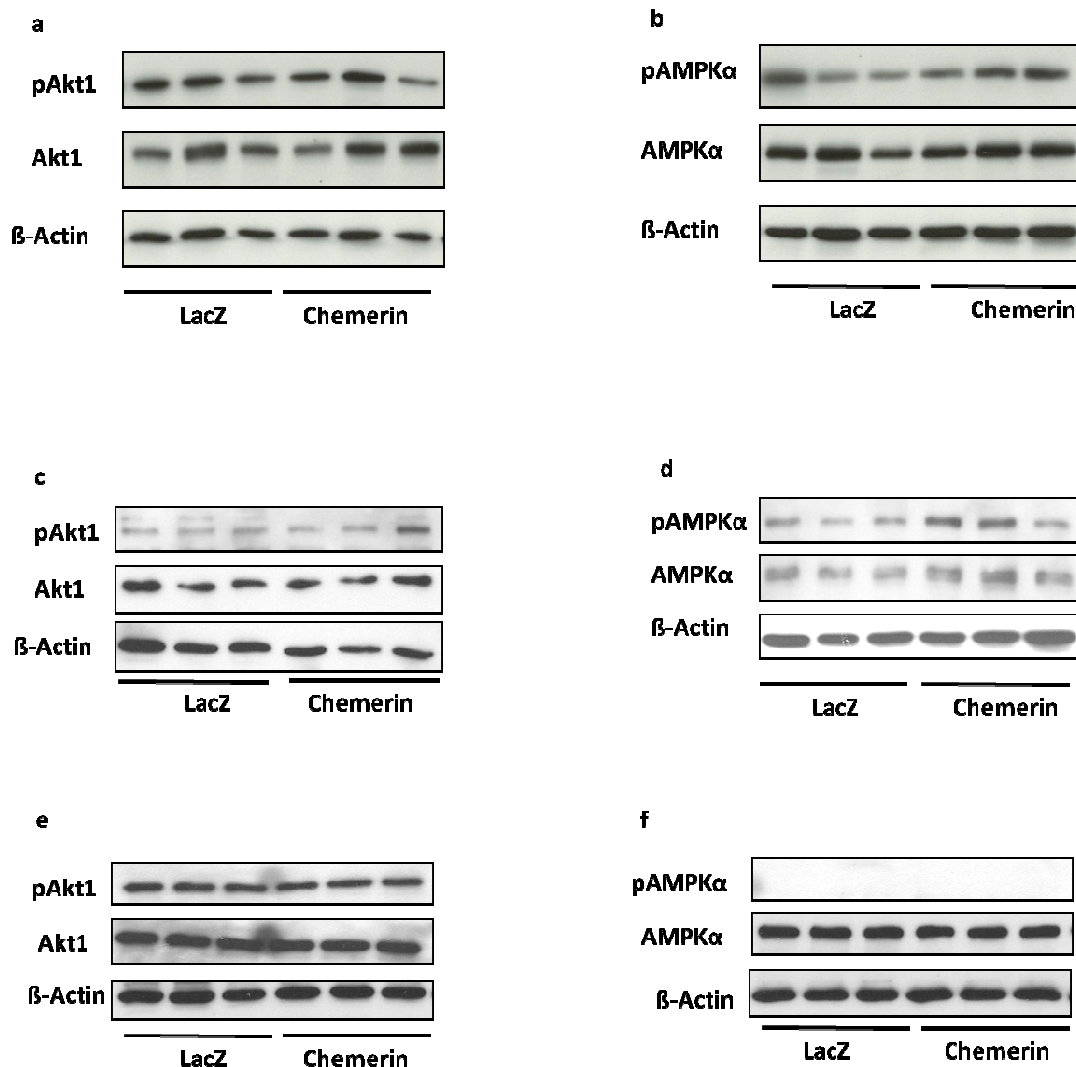


Abbildung 4-8: Effekt von Chemerin auf die Insulin stimulierte Akt1 Phosphorylierung und AMPK α Phosphorylierung in Leber (a, b), Skelettmuskulatur (c, d) und gonadalem Fettgewebe (e, f) von 3 repräsentativen C57BL/6 Mäusen/Gruppe injiziert mit 1×10^{13} Partikeln AAV.LacZ oder AAV.Chemerin (Daten repräsentativ für n=4/Gruppe).

In der Leber wurde zusätzlich nach Regulation von Schlüsselgenen der Glukoneogenese auf mRNA-Ebene geschaut, um die eine Erhöhung der Blutglukose zur Glukoneogenese der Leber auszuschließen. Bei identischer Nüchtern-Blutglukosekonzentration in beiden Gruppen (112 ± 16 mg/dl) hatte Chemerin keinen Effekt auf die hepatische Expression der Schlüsselenzyme der Glukoneogenese, G6P und PEPCK, was durch eine Messung der mRNA-Expression bestätigt wurde (Abbildung 4-9).

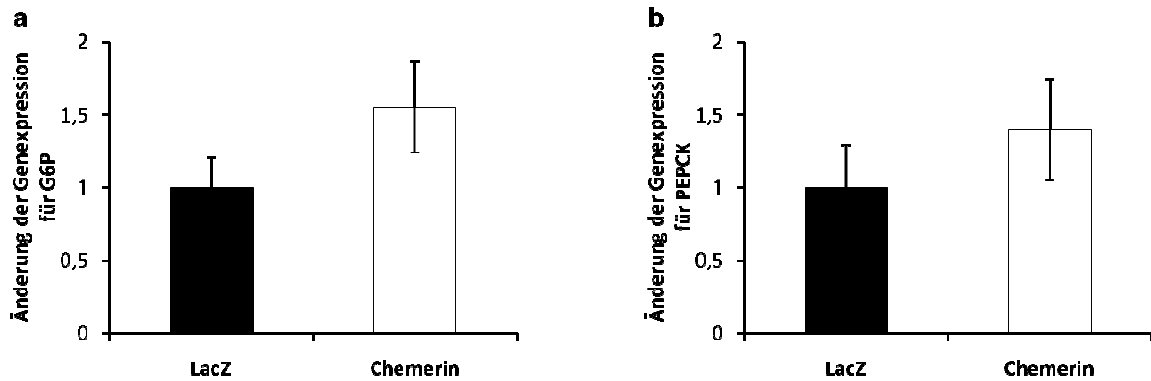


Abbildung 4-9: mRNA Expression von Glucose-6-Phosphatase (G6P) (a) und Phosphoenolpyruvat-Carboxynase (PEPCK) (b) in der Leber von C57BL/6 Mäusen injiziert mit 1×10^{13} Partikeln AAV.LacZ oder AAV.Chemerin (n=7/Gruppe).

Zusammenfassend resultiert die Expression von Chemerin in C57BL/6 Mäusen auf HFD in einer diskreten Verschlechterung des Glukosestoffwechsel im ipGTT. Es konnte keine Verminderung der Insulinsekretion oder der Insulinsensitivität festgestellt werden. Ebenso konnte keine Regulation der Expression von Genen der Glukoneogenese auf mRNA-Ebene und von Proteinen des Insulinsignalwegs gezeigt werden.

4.1.4 Effekt von Chemerin auf die Serumlipide in C57BL/6 Mäusen

Chemerin korreliert in verschiedenen Populationen positiv mit TG-Spiegeln und invers mit HDL-C [88, 93, 97, 128, 139]. Deshalb wurden in regelmäßigen Abständen über den gesamten Versuchszeitraum die Serumlipide der C57BL/6 Tiere unter ND und HFD gemessen. Während der ersten 8 Wochen auf ND zeigte sich im Verlauf bzgl. des Gesamtcholesterins, TG, HDL-C und non-HDL-C kein reproduzierbar signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen (Abbildung 4-10 a-c). Nach den ersten 8 Wochen auf ND wurden die Tiere auf eine HFD gesetzt. Hier zeigte sich weiterhin im Verlauf kein Unterschied in den Serumlipiden zwischen den beiden Gruppen (Abbildung 4-10).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass sich weder unter ND noch unter HFD ein reproduzierbarer signifikanter Unterschied in Gesamtcholesterin, HDL-C, non-HDL-C und TG zwischen den Chemerin-exprimierenden Tieren und Kontrolltieren zeigte (Abbildung 4-10).

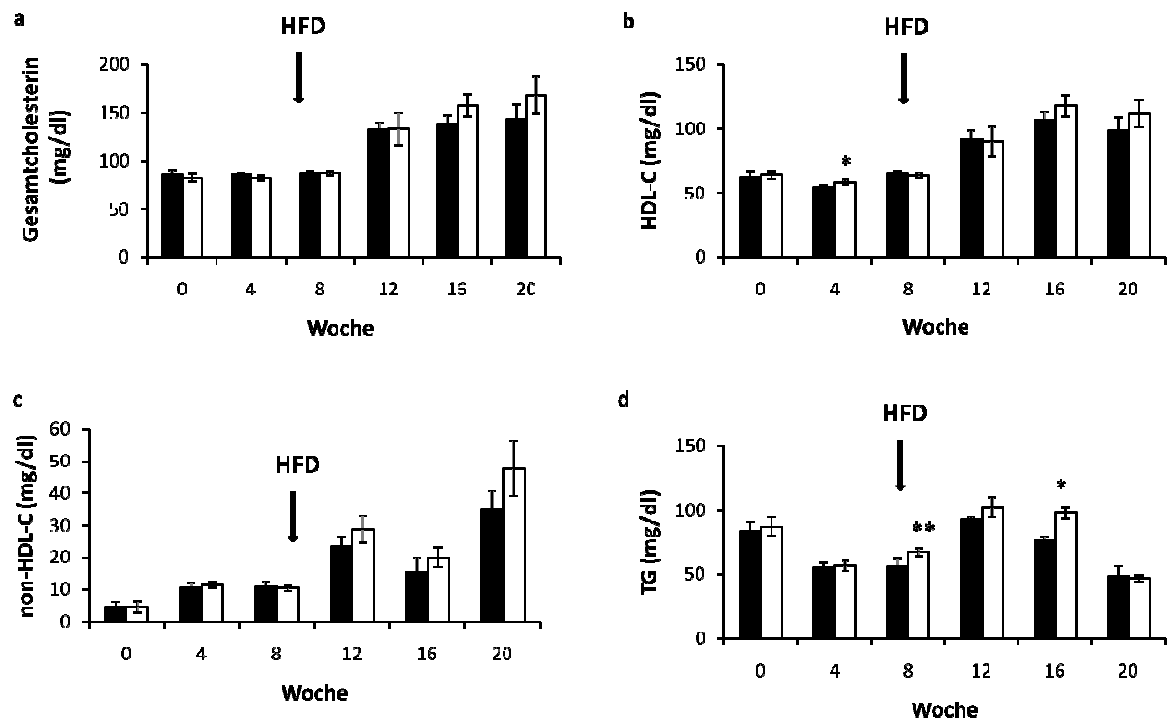


Abbildung 4-10: Messung der Serumlipide in C57BL/6 Mäusen injiziert mit 1×10^{13} Partikeln AAV.LacZ (schwarz) oder AAV.Chemerin (weiß) ($n=7$ /Gruppe) über 20 Wochen unter ND und HFD. Gesamtcholesterin (a), HDL-C=HDL-Cholesterin; non-HDL-C=non-HDL-Cholesterin (c), TG=Triglyceride (d). * $p<0,05$; ** $p<0,01$

4.2 Effekte von humanem Chemerin auf die Regulation von Glukose- und Lipidstoffwechsel in LDLR-KO Mäusen

In der in C57BL/6 Mäusen durchgeführten Studie, zeigte sich, dass die Expression von humanem Chemerin zu einer diskreten Verschlechterung der Glukosetoleranz führte. Um dieses Ergebnis in einem zweiten diätinduzierten Mausmodell der Insulinresistenz zu verifizieren, wurde Chemerin in LDLR-KO Mäusen auf HFD mittels AAV exprimiert. LDLR-KO Mäuse stellen ein klassisches Mausmodell zur Untersuchung des Lipidstoffwechsels und der Atherosklerose dar [199-201]. LDLR-KO Mäuse entwickeln nach mehrwöchiger HFD eine Insulinresistenz mit pathologischer Glukosetoleranz [202-203], so dass der Effekt von Chemerin auf Lipid- und Glukosestoffwechsel sowie Atherosklerose in diesem Mausmodell untersucht werden kann.

Für das Experiment wurden die Tiere in zwei Gruppen à 12 Tiere, paarweise nach Gewicht und Gesamtcholesterin zugeordnet. Gruppe 1 wurde 1×10^{13} AAV.Chemerin Partikel und Gruppe 2 1×10^{13} AAV.LacZ Partikel über die Schwanzvene injiziert. Nach der Virusinjektion erhielten die Tiere die HFD für 16 Wochen. Der Versuchsablauf ist in Abbildung 4-11 schematisch dargestellt.

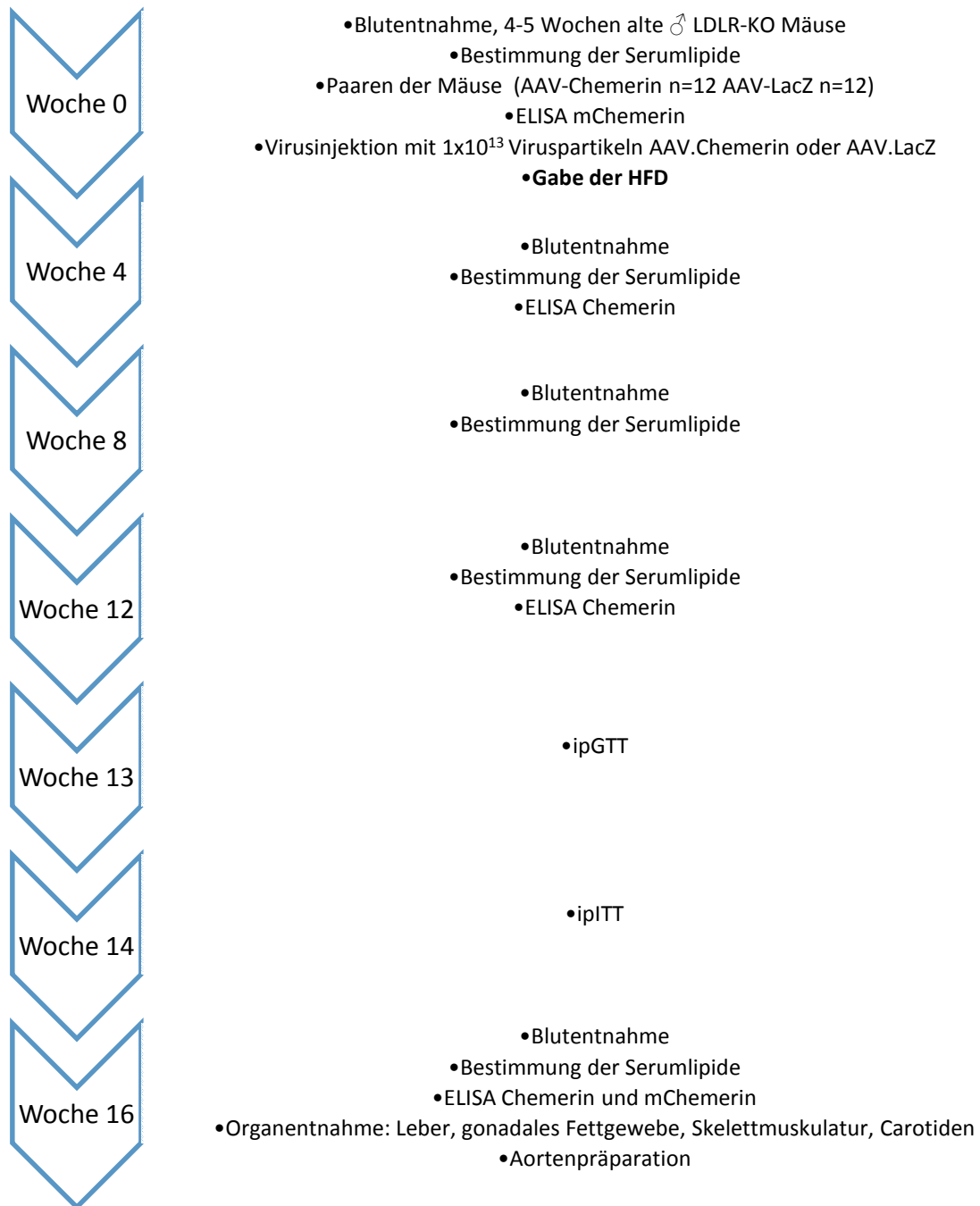


Abbildung 4-11: Schematische Darstellung des Versuchsablaufs in LDLR-KO Mäusen

4.2.1 Nachweis der AAV-vermittelten humanen Chemerin Expression in LDLR-KO Mäusen

4.2.1.1 Nachweis der Chemerin mRNA-Expression in LDLR-KO Mäusen

Nach Beendigung des Versuchs in Woche 16 wurden die Mäuse getötet und aus Leber, Skelettmuskel (Musculus Soleus) und gonadalem Fettgewebe RNA isoliert, um so die Expression von Chemerin auf mRNA-Ebene mittels quantitativer qRT-PCR zu bestimmen.

Die Injektion von AAV.Chemerin führte zu einer leber- und fettgewebsspezifischen mRNA-Expression von humanem Chemerin (Abbildung 4-12 a und b).

Zur Kontrolle, ob Chemerin in weiteren Geweben exprimiert wurde, wurde die mRNA-Expression von humanem Chemerin im Skelettmuskel und in der Carotis gemessen. Hier konnte keine Expression des humanen Chemerin gezeigt werden (Abbildung 4-12 c und d).

Um auszuschließen, dass die AAV-vermittelte mRNA-Expression von humanem Chemerin die physiologische Expression des mChemerin beeinflusst, wurde in der Leber die mRNA-Expression von mChemerin gemessen. Es zeigte sich keine Veränderung der mChemerin mRNA-Expression nach AAV.Chemerin Injektion im Vergleich zur Kontrollgruppe (Abbildung 4-12 e).

4.2.1.2 Nachweis von Chemerin im Serum von LDLR-KO Mäusen

Mit einer Western-Blot-Analyse konnte humanes Chemerin als sezerniertes Protein im Serum der Mäuse spezifisch nachgewiesen werden (Abbildung 4-13). Chemerin konnte nur in der mit AAV.Chemerin injizierten Gruppe nachgewiesen werden. In der LacZ-Gruppe erfolgt keine Detektion des Proteins (Abbildung 4-13). Als Kontrolle wurde das Serum eines gesunden Probanden mitgeführt.

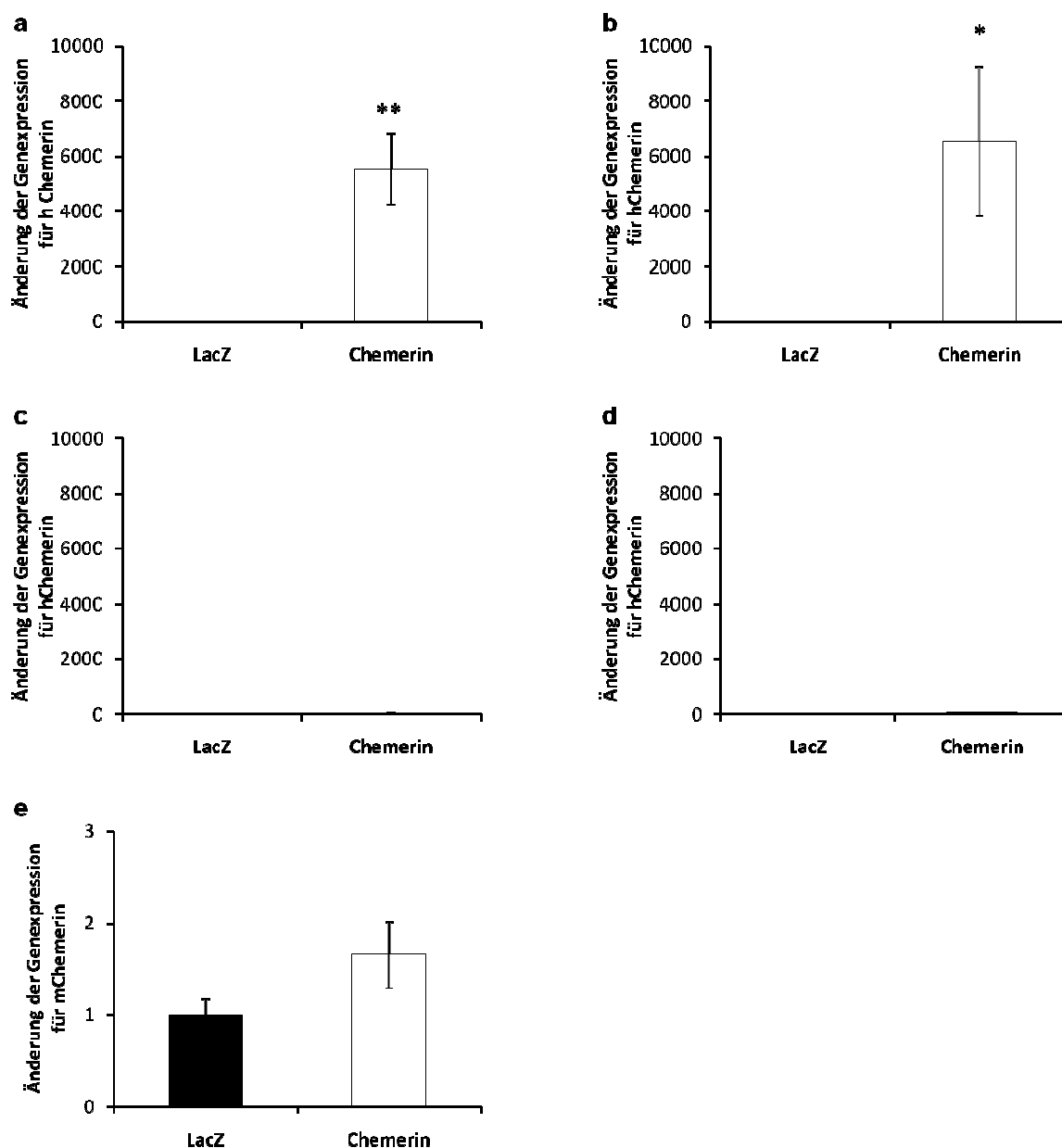


Abbildung 4-12: mRNA-Expression von Chemerin in LDLR-KO Mäusen injiziert mit 1×10^{13} Partikeln AAV.LacZ oder AAV.Chemerin ($n=12/\text{Gruppe}$). Leber (a), gonadales Fettgewebe (b), Skelettmuskulatur (c) und Carotiden (d). Expression von mChemerin mRNA in der Leber (e) von LDLR-KO Mäusen injiziert mit 1×10^{13} Partikeln AAV.LacZ oder AAV.Chemerin ($n=12/\text{Gruppe}$). * $p<0,05$; ** $p<0,01$

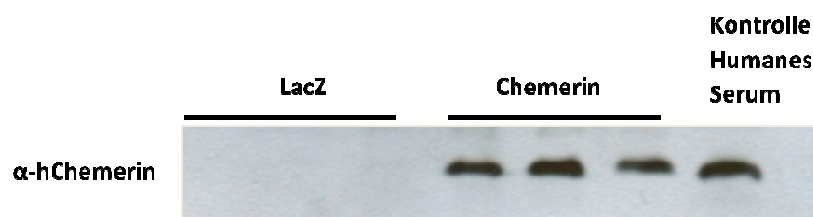


Abbildung 4-13: Western-Blot-Analyse der humanen Chemerinexpression im Serum von 3 repräsentativen LDLR-KO Mäusen, injiziert mit 1×10^{13} Partikeln AAV.LacZ oder AAV.Chemerin. Kontroll-Serum eines gesunden Probanden.

Der Nachweis von humanem Chemerin im Serum der Mäuse erfolgte außerdem zu verschiedenen Zeitpunkten vor, sowie 4, 12 und 16 Wochen nach Virusinjektion mittels eines ELISA-Tests. Zu jedem Zeitpunkt wurden Positivkontrollen von gesunden Probanden mitgeführt, die gleichzeitig als interne Kontrolle dienten.

Die Expression von Chemerin zeigte einen zeitabhängigen Verlauf und erreichte nach 16 Wochen einen maximalen Serum-Chemerinspiegel (Chemerin-exprimierende Gruppe $114 \pm 33,73$ ng/ml; Kontrollgruppe 0 ng/ml), der der physiologischen Serum-Chemerinkonzentration gesunder Probanden entspricht (Abbildung 4-14).

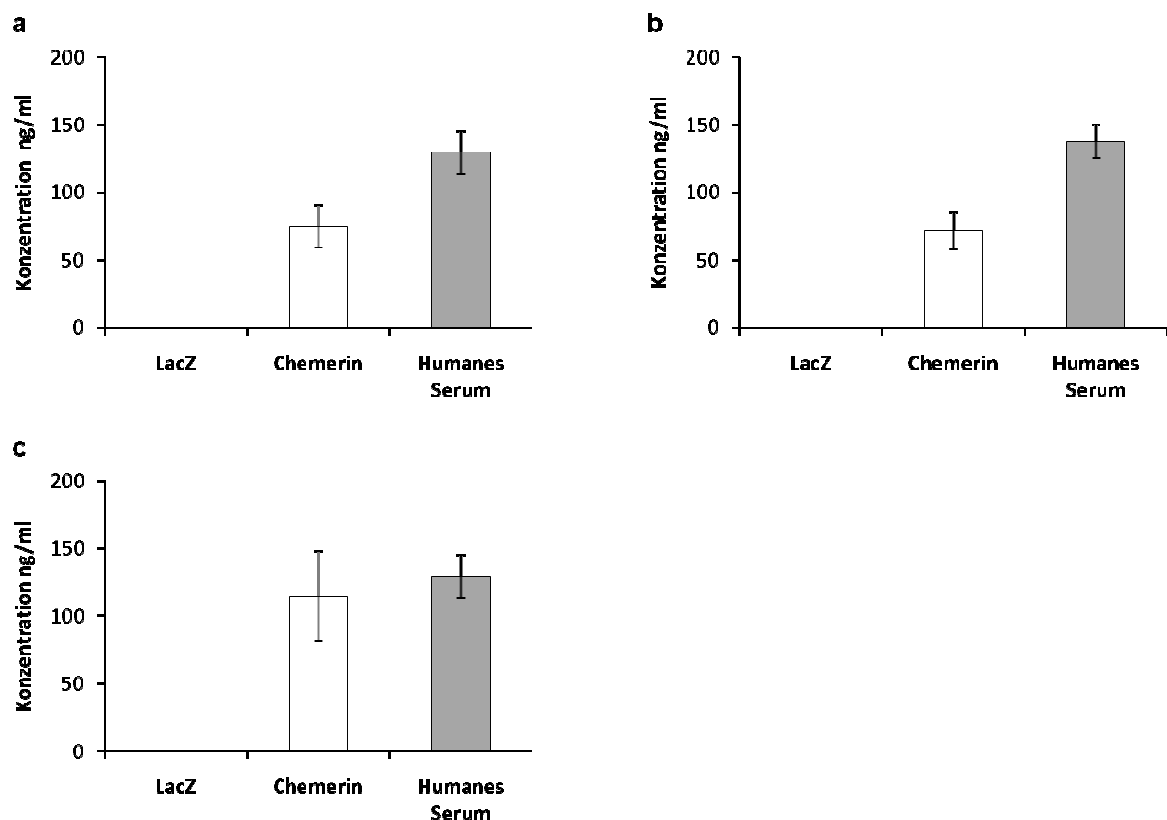


Abbildung 4-14: Konzentration von humanem Chemerin (ng/ml) im Serum 4 Wochen (a), 12 Wochen (b) und 16 Wochen (c) nach der Injektion von LDLR-KO Mäusen mit 1×10^{13} Partikeln AAV.LacZ- oder AAV.Chemerin ($n=12$ /Gruppe). Als Referenz wurde Serum von gesunden Probanden ($n=3$) verwendet.

Um auszuschließen, dass die AAV-induzierte Expression von humanem Chemerin Einfluss auf die murinen Serum-Chemerinspiegel hatte, wurde ein ELISA-Test spezifisch für mChemerin durchgeführt. Die Konzentration wurde in den 4-5 Wochen alten Tieren vor der Virusinjektion (Abbildung 4-15 a), sowie 16 Wochen nach Virusinjektion im Serum der Tiere gemessen. In den 4-5 Wochen alten LDLR-KO Mäusen war die Konzentration von mChemerin nicht signifikant unterschiedlich (Chemerin-exprimierende Gruppe $33,53 \pm 0,28$ ng/ml, Kontrollgruppe $33,05 \pm 0,31$ ng/ml, $p=ns$). Die Expression von

humanem Chemerin hatte keinen Einfluss auf die murinen Serum-Chemerinspiegel in beiden Gruppen (Abbildung 4-15b) (Chemerin Gruppe $96,04 \pm 8,3$ ng/ml, LacZ-Gruppe $92,32 \pm 4,6$ ng/ml, $p=ns$).

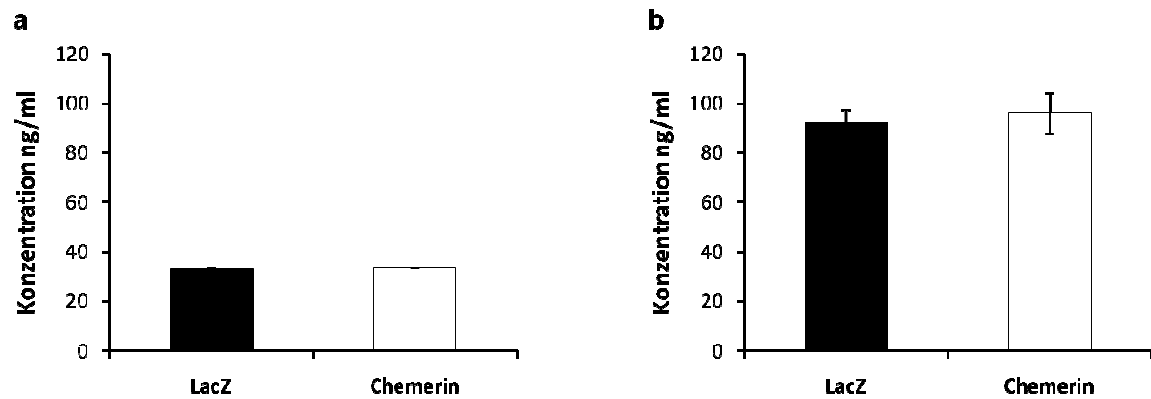


Abbildung 4-15: Konzentration von mChemerin im Serum von LDLR-KO Mäusen im Alter von 4-5 Wochen ($n=5$ /Gruppe) vor Virusinjektion (a) und 16 Wochen (b) nach Injektion mit 1×10^{13} Partikeln AAV.LacZ oder AAV.Chemerin.

4.2.2 Effekt von Chemerin auf das Körpergewicht von LDLR-KO Mäusen

Aus bisherigen epidemiologischen Studien ist bekannt, dass die Serum-Chemerinspiegel mit dem Körpergewicht korrelieren [88, 93, 128]. Im Versuch mit den Wildtyp C57BL/6 Mäusen konnte diese Hypothese nicht bestätigt werden. Hier zeigte sich kein Unterschied in der Gewichtszunahme der Chemerin-exprimierenden Tiere im Vergleich zu den Kontrolltieren (Abbildung 4-16). Ebenso zeigte sich nach 16 Wochen kein Unterschied in der Gewichtszunahme zwischen den Chemerin-exprimierenden LDLR-KO Mäusen und den Kontrollmäusen (Abbildung 4-16). Zusammenfassend konnte keine Assoziation zwischen der Expression von Chemerin und dem Körpergewicht gezeigt werden.

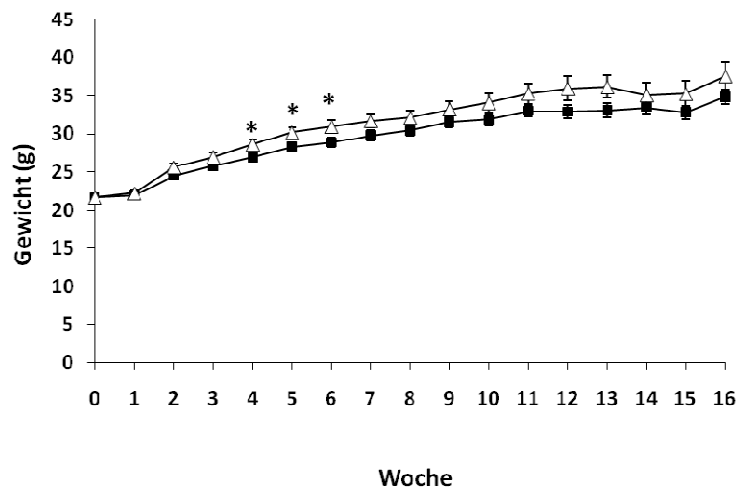


Abbildung 4-16: Gewichtsverlauf LDLR-KO Mäuse injiziert mit 1×10^{13} Partikeln AAV.LacZ (schwarze Quadrate) oder AAV.Chemerin (weiße Dreiecke) (n=12/Gruppe) über 16 Wochen unter HFD. * $<0,05$

4.2.3 Effekt von Chemerin auf den Glukosestoffwechsel von LDLR-KO Mäusen

Chemerin führte in C57BL/6 Mäusen zu leicht erhöhten Blutglukosewerten im ipGTT (Abbildung 4-7 a). Um den Effekt von Chemerin auf den Glukosemetabolismus in den LDLR-KO Mäusen (n=10) zu untersuchen wurde nach 12-wöchiger HFD ebenfalls ein ipGTT durchgeführt.

Wie bei dem Versuch in C57BL/6 Mäusen war die Nüchtern-Blutglukosekonzentration in beiden LDLR-KO-Gruppen nicht signifikant unterschiedlich (Chemerin-exprimierende Gruppe 89 ± 9 mg/dl; Kontrollgruppe 81 ± 4 mg/dl, p=ns). Während sich in den ersten 15 min nach Glukoseinjektion ein vergleichbarer Blutzuckeranstieg in beiden Gruppen zeigte, wiesen die Chemerin-exprimierenden Tiere im weiteren Verlauf 30-120 min nach Glukoseinjektion signifikant höhere Blutzuckerwerte als die Kontrolltiere auf (Abbildung 4-17 a).

Um zu prüfen, ob die pathologische Glukosetoleranz der Chemerin-exprimierenden Tiere durch eine verminderte Insulinsekretion verursacht wurde, wurden vor und 30 min nach Glukoseinjektion die Insulinspiegel in beiden Gruppen gemessen. Die Insulinspiegel der Chemerin-exprimierenden Tiere und der Kontrolltiere waren vor und nach Glukoseinjektion nicht signifikant unterschiedlich (Abbildung 4-17).

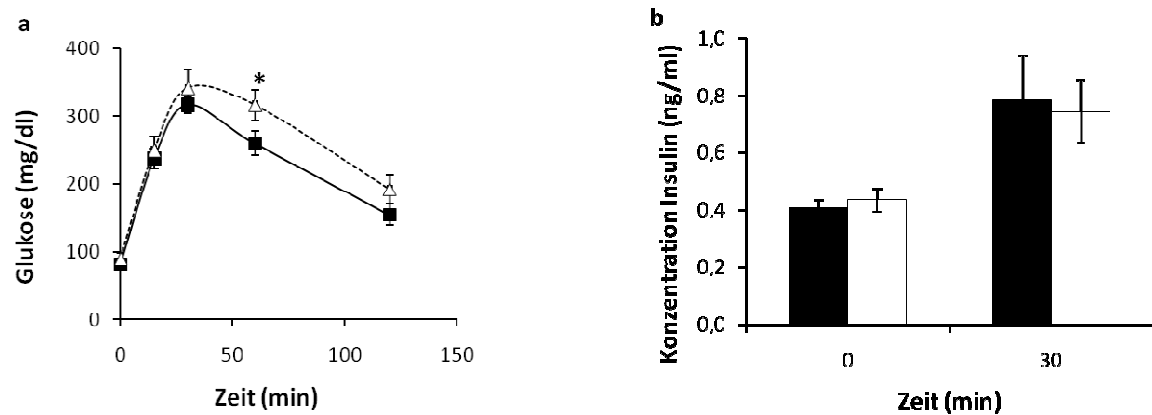


Abbildung 4-17: Effekt von Chemerin auf Glukose-(a) und Insulinspiegel (b) während des ipGTTs in LDLRKO Mäusen 12 Wochen auf HFD nach der Injektion mit 1×10^{13} Partikeln AAV.LacZ (schwarze Vierecke) oder AAV.Chemerin (weiße Dreiecke) (n=10/Gruppe). *p<0,05

Um zu überprüfen, ob die Expression von Chemerin eine pathologische Glukosetoleranz infolge einer Insulinresistenz induziert, wurde nach 13 Wochen auf HFD ein ipITT (n=10 Tiere/Gruppe) durchgeführt. Die Nüchtern-Blutglukosewerte waren in beiden Gruppen vergleichbar (Chemerin-exprimierende Gruppe $89,7 \pm 4$ mg/dl; Kontrollgruppe $81,5 \pm 5$ mg/dl, p=ns). Im Verlauf des ipITT zeigt die Chemerin-exprimierende Gruppe nach Insulininjektion einen deutlich geringeren Abfall der Blutglukose im Vergleich zur Kontrollgruppe (Abbildung 4-18), so dass die Expression von Chemerin in LDLR-KO Mäusen auf HFD zu einer systemischen Insulinresistenz führt.

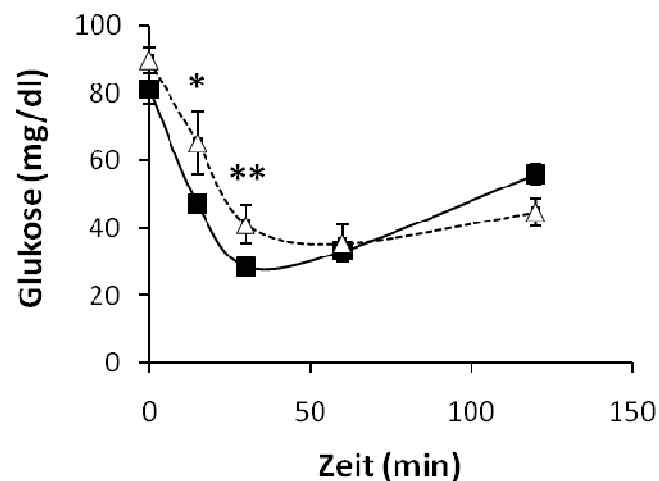


Abbildung 4-18: Effekt von Chemerin auf Glukose während des ipITTs in LDLR-KO Mäusen 13 Wochen auf HFD nach der Injektion mit 1×10^{13} Partikeln AAV.LacZ (schwarze Vierecke) oder AAV.Chemerin (weiße Dreiecke) (n=10/Gruppe). *p<0,05; **p<0,01

Um zu überprüfen, ob die Überexpression von Chemerin in LDLR-KO Mäusen eine gewebespezifische Insulinresistenz erzeugt, wurde die Insulinsignalkaskade in Leber, Skelettmuskulatur und gonadalem Fettgewebe untersucht. Hierzu wurde die Phosphorylierung von Akt1 und AMPK α nach Insulinstimulation mittels Immunoblotting-Analyse untersucht.

Die Chemerin-exprimierenden Tiere und die Kontrollmäuse zeigen keinen Unterschied in der basalen und durch Insulin vermittelten Phosphorylierung von Akt1 und der Phosphorylierung von AMPK α in Leber (Abbildung 4-19).

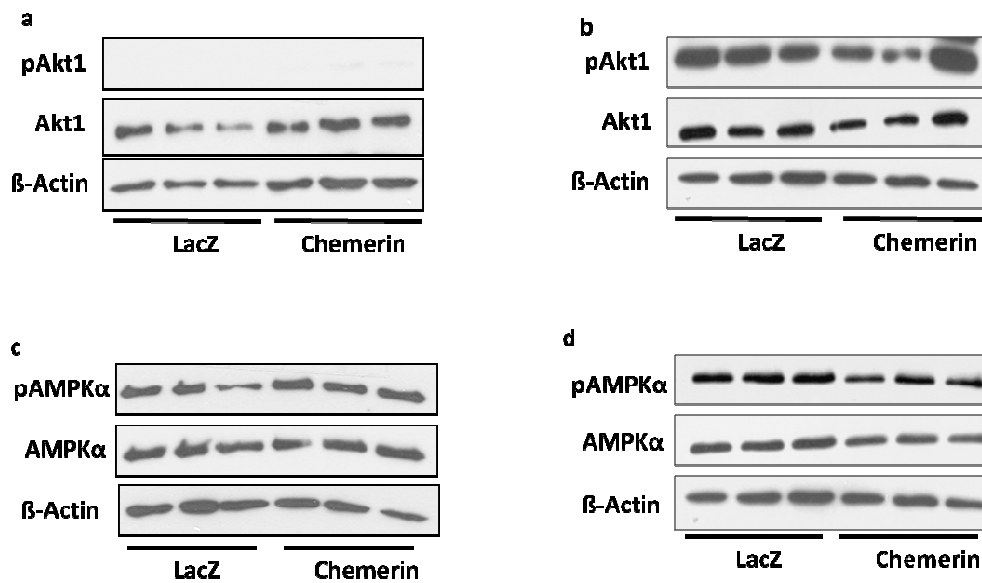


Abbildung 4-19: Effekt von Chemerin auf die basale und Insulin stimulierte Akt1 Phosphorylierung (a, b) und AMPK α Phosphorylierung (c, d) in der Leber von drei repräsentativen LDLRKO Mäusen/Gruppe injiziert mit 1×10^{13} Partikeln AAV.LacZ oder AAV.Chemerin (Daten repräsentativ für $n=6$ /Gruppe).

Um auszuschließen, dass die signifikant höheren Blutglukosewerte durch eine erhöhte Glukoneogenese in der Leber hervorgerufen wurden, wurde die Genexpression der Schlüsselenzyme der Glukoneogenese in der Leber gemessen. Bei annähernd identischen Nüchtern-Blutglukosekonzentration in beiden Gruppen hatte Chemerin keinen Effekt auf die hepatische Expression der Schlüsselenzyme der Glukoneogenese, G6P und PEPCK (Abbildung 4-20).

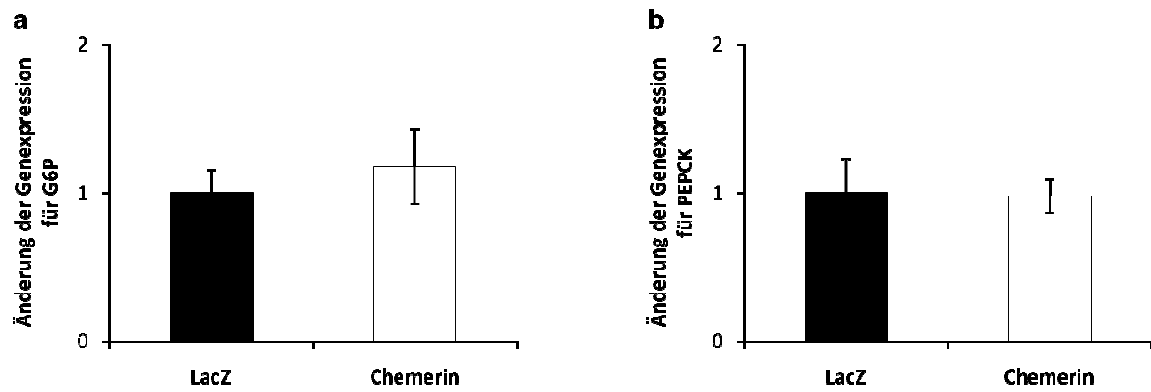


Abbildung 4-20: mRNA Expression von G6P (a) und PEPCK (b) in der Leber von LDLR-KO Mäusen injiziert mit 1×10^{13} Partikeln AAV.LacZ oder AAV.Chemerin (n=12/Gruppe).

Auch im gonadalen Fettgewebe der Tiere wurde die basale und insulinstimulierte Phosphorylierung von Akt1 und AMPK α analysiert. Wie in der Leber fanden sich hier keine Unterschiede in der basalen und insulinstimulierten Phosphorylierung von Akt1 und AMPK α (Abbildung 4-21).

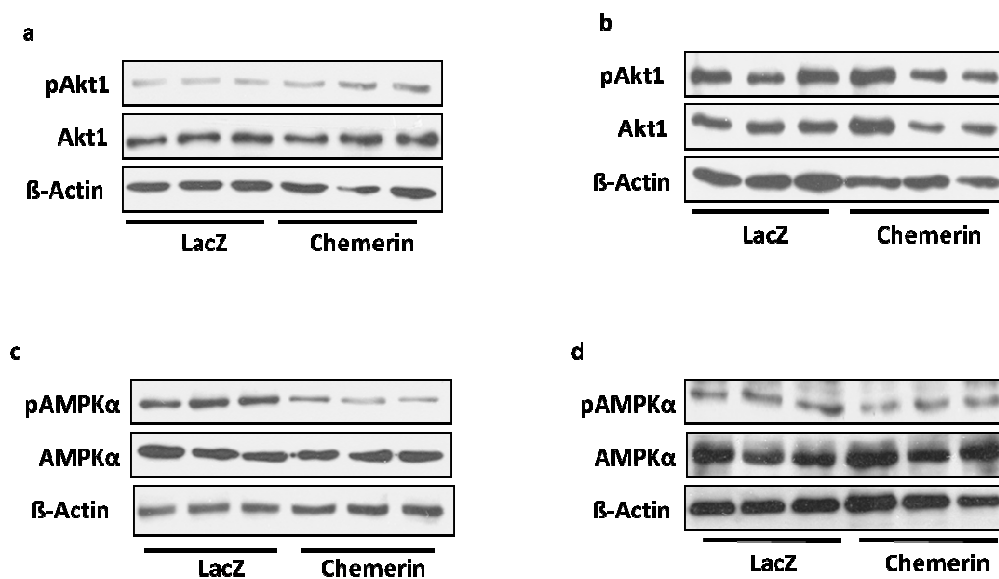


Abbildung 4-21: Effekt von Chemerin auf die basale und Insulin stimulierte Akt1 Phosphorylierung (a, b) und AMPK α Phosphorylierung (c, d) im gonadalen Fettgewebe von drei repräsentativen LDLRKO Mäusen/Gruppe injiziert mit 1×10^{13} Partikeln AAV.LacZ oder AAV.Chemerin (Daten repräsentativ für n=6/Gruppe).

Im Skelettmuskel hingegen führte die Expression von Chemerin zu einer signifikanten Abnahme der insulinstimulierten Phosphorylierung von Akt1 und AMPK α (Abbildung 4-22 b und d). Um sicher zu gehen, dass der Unterschied in der Phosphorylierung von Akt1 und AMPK α nicht bereits unter basalen Bedingungen bestand, wurde die Phosphorylierung von Tieren ohne Insulininjektion verglichen. Hier

zeigt sich, dass basal kein Unterschied in der Phosphorylierung von Akt1 und AMPK α vorlag (Abbildung 4-22 a und c).

Zusammenfassend erzeugte die Expression von Chemerin LDLR-KO Mäusen unter HFD eine gewebespezifische Insulinresistenz im Skelettmuskel der Tiere, die zu einer verschlechterten Glukosetoleranz der Chemerin-exprimierenden Tiere im ipGTT führte.

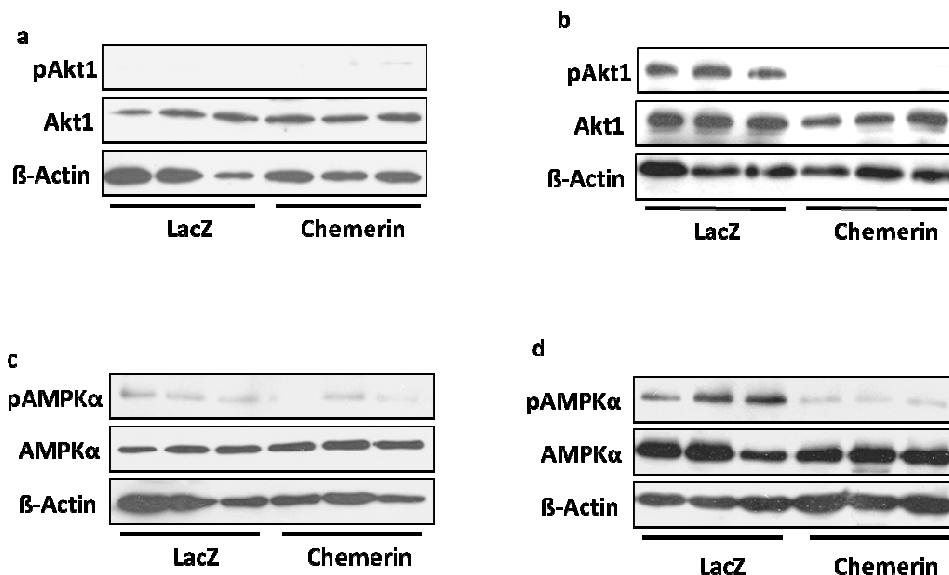


Abbildung 4-22: Effekt von Chemerin auf die basale und Insulin stimulierte Akt1 Phosphorylierung (a, b) und AMPK α Phosphorylierung (c, d) im Skelettmuskel von drei repräsentativen LDLRKO Mäusen/Gruppe injiziert mit 1×10^{13} Partikeln AAV.LacZ oder AAV.Chemerin (Daten repräsentativ für $n=6$ /Gruppe).

4.2.4 Effekt von Chemerin auf die Serumlipide in LDLR-KO Mäusen

In C57BL/6 Mäusen konnte keine Korrelation zwischen den Serum-Chemerinspiegel und den Serumlipiden gezeigt werden. Da LDLR-KO Mäuse auf HFD eine deutliche Erhöhung apoB-haltiger Lipoproteine (VLDL, LDL) [200] aufweisen, stellen sie ein zur Wildtypmaus („HDL-Mausmodell“) komplementäres Mausmodell zur Untersuchung der Effekte von Chemerin auf die Serumlipide dar.

Zu Beginn des Versuchs wurden die Tiere nach Gesamtcholesterin und Gewicht paarweise zugeordnet (Abbildung 4-11). Während den ersten 4 Wochen auf HFD kam es zu einem starken diätinduzierten Anstieg des Gesamtcholesterins und non-HDL-C (Abbildung 4-23 a und c).

Es zeigte sich kein reproduzierbarer signifikanter Unterschied im Gesamtcholesterin, HDL-C, non-HDL-C und TG zwischen Chemerin-exprimierenden Tieren und Kontrolltieren zeigte (Abbildung 4-23).

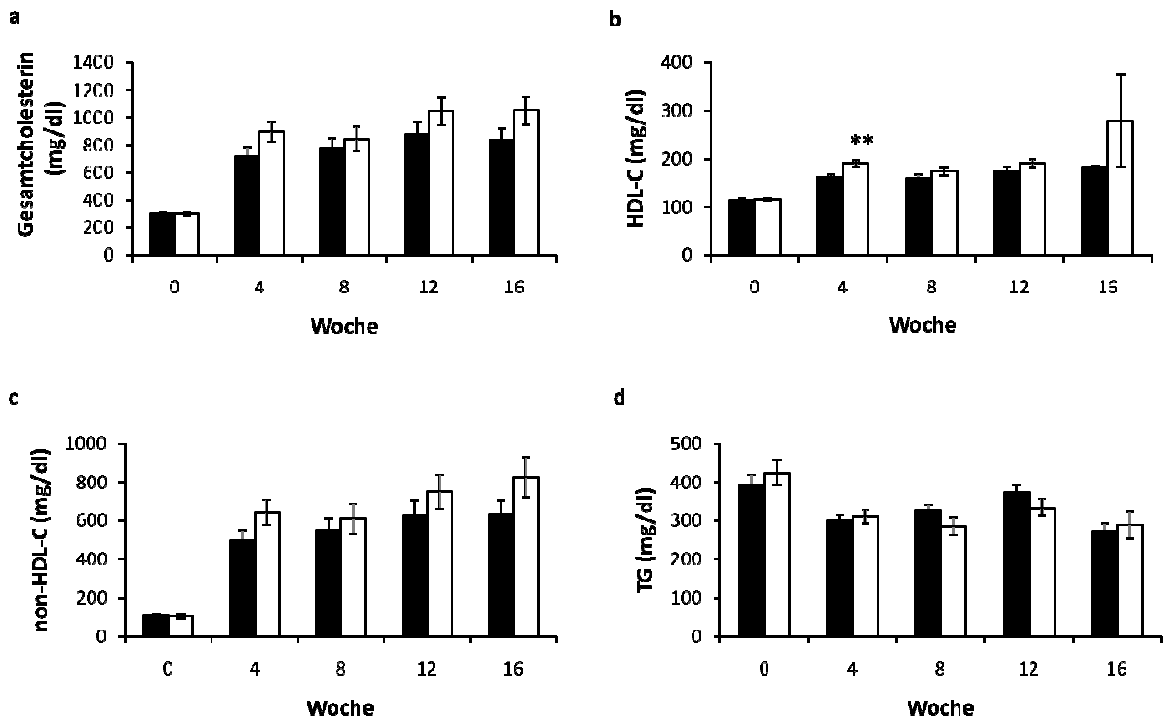


Abbildung 4-23: Messung der Serumlipide in LDLR-KO Mäusen injiziert mit 1×10^{13} Partikeln AAV.LacZ (schwarz) oder AAV.Chemerin (weiß) ($n=12$ /Gruppe) über 16 Wochen unter HFD. Gesamtcholesterin (a), HDL-C=HDL-Cholesterin; non-HDL-C=non-HDL-Cholesterin (c), TG=Triglyceride (d). ** $p \leq 0,01$

4.2.5 Effekt von Chemerin auf Atherosklerose in LDLR-KO Mäusen

LDLR-KO Mäuse auf HFD sind ein klassisches Modell zur Untersuchung von Atheroskleroseentstehung *in vivo* [199, 201]. Obwohl die Tiere keine Unterschiede in den Serumlipiden zeigten, wurden der Effekt von Chemerin auf die Atherosklerose untersucht, da außer der Dyslipoproteinämie auch Insulinresistenz und mögliche Effekte von Chemerin auf lokale und systemische Immunzellen [92, 99, 117, 204] einen Effekt auf die Entstehung von Atherosklerose haben können.

Um den Effekt von Chemerin auf Atherosklerose in LDLR-KO Mäusen auf HFD festzustellen, wurde nach 16 Wochen auf HFD der Versuch beendet und die gesamte Aorta der Tiere präpariert, um atherosklerotische Plaques zu quantifizieren (Abbildung 4-24 a). Für die Chemerin-exprimierende Gruppe und die Kontrollgruppe ergab sich kein signifikanter Unterschied in der durchschnittlichen Plaques-Fläche pro Gesamtaorta (Abbildung 4-24 b).

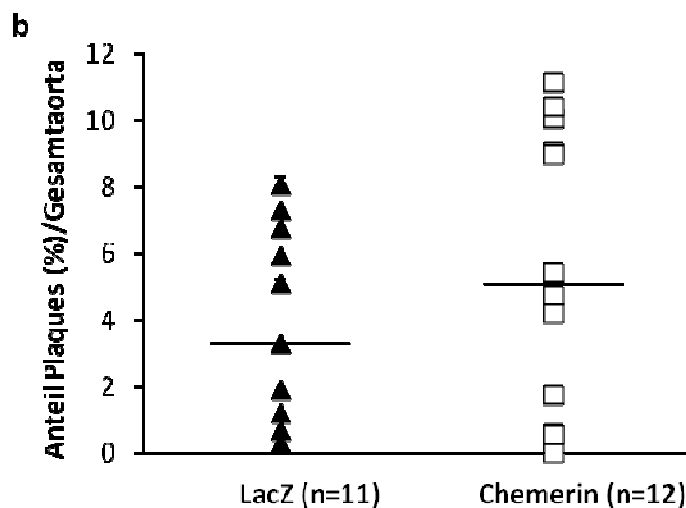
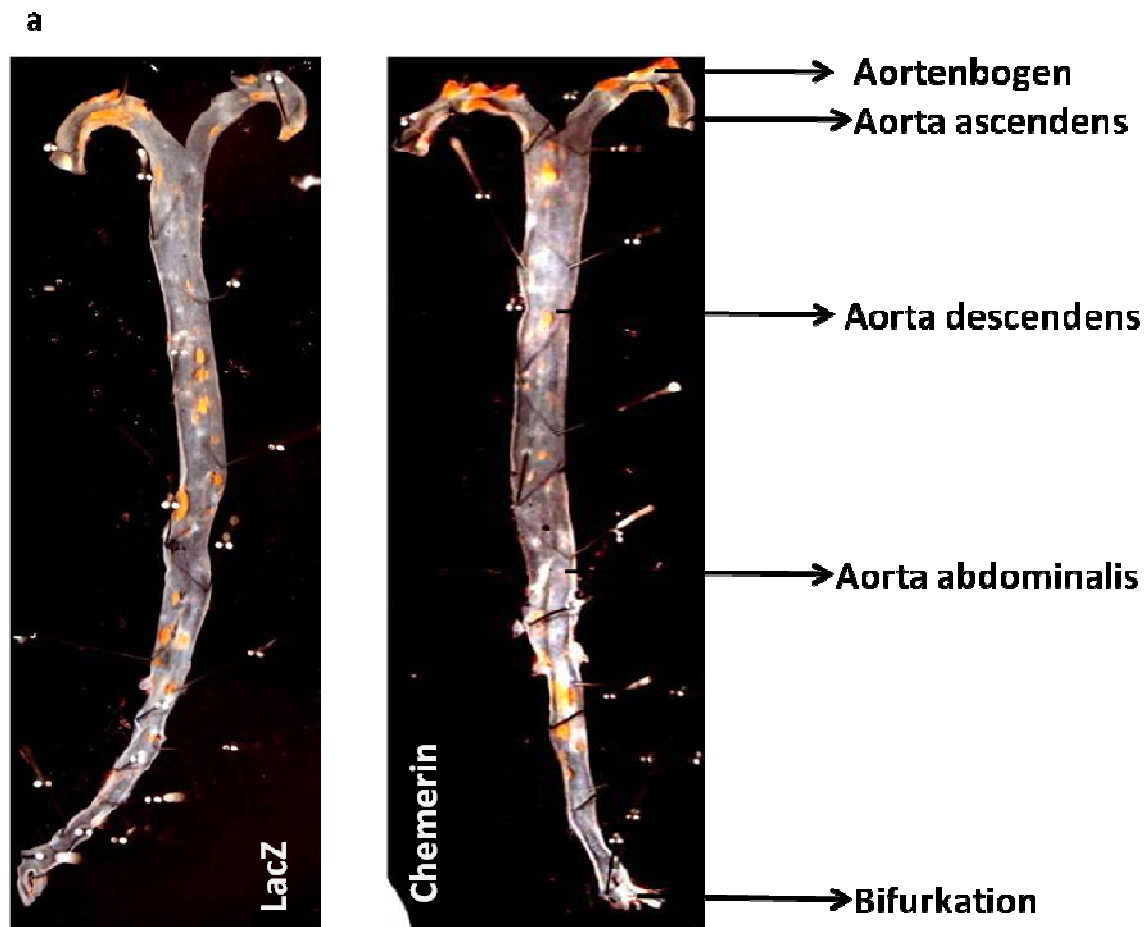


Abbildung 4-24: Effekt von Chemerin auf den atherosklerotischen Plaqueanteil, ermittelt durch *en face* Quantifizierung der gesamten Aorta von LDLRKO Mäusen auf HFD injiziert mit 1×10^{13} Partikeln AAV.LacZ (n=11) oder AAV.Chemerin (n=12). Bilder der Oil-Red-O gefärbten Gesamtaorta (a) und prozentualer Anteil der atherosklerotischen Plaquefläche/Gesamtaorta (b).

5 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurden die Effekte des Hepatoadipokins Chemerin auf den Glukose- und Lipidstoffwechsel *in vivo* in zwei komplementären diätinduzierten Mausmodellen der Insulinresistenz und Dyslipoproteinämie untersucht. Das seit kurzem bekannte Hepatoadipokin Chemerin beeinflusst in verschiedenen *in vitro*- und *in vivo*-Studien Effekte auf den Glukose- und Lipidmetabolismus, sowie Inflammation [88, 128-129]. Klinische Daten zeigen, dass Chemerin mit allen Komponenten des MetS assoziiert ist [87, 178, 184]. Deshalb war das Ziel der Studie, die Rolle von Chemerin im Zusammenhang mit der Pathogenese des MetS zu untersuchen, um mögliche neue Ansatzpunkte für zukünftige Therapien des MetS bzw. dessen Folgeerkrankungen aufzuzeigen. Hierfür wurde humanes Chemerin über ein Adeno-assoziiertes virales Vektorsystem in C57BL/6 Wildtypmäusen auf ND und HFD sowie LDLR-KO Mäusen auf HFD exprimiert und die Effekte auf Gewichtszunahme, Glukose- und Lipidmetabolismus, sowie Atherosklerose *in vivo* untersucht.

C57BL/6 Mäuse stellen ein klassisches HDL-C Mausmodell dar und eignen sich gut zur Untersuchung des Glukosemetabolismus [194-198], da sie nach einer mehrwöchigen HFD eine Insulinresistenz mit pathologischer Glukosetoleranz entwickeln. Als ein zweites komplementäres Mausmodell wurden LDLR-KO Mäuse gewählt, denn sie stellen ein klassisches Mausmodell zur Untersuchung des non-HDL-C Metabolismus und der Atherosklerose [199-201] dar. LDLR-KO Mäuse entwickeln wie C57BL/6 Mäuse nach einer mehrwöchigen HFD eine Insulinresistenz mit pathologischer Glukosetoleranz [202-203]. Der LDLR-KO Mausstamm wird in vielen Forschungsgebieten verwendet und ist besonders für die Untersuchung von Atherosklerose und Glukose- und Lipidmetabolismus geeignet, da diese Tiere durch eine HFD Adipositas und Insulinresistenz entwickeln. Das diätinduzierte Adipositas-Mausmodell kommt somit der durch Überernährung hervorgerufenen, menschlichen Insulinresistenz recht nahe. Da in der vorliegenden Studie der Effekt von Chemerin auf Glukose-, Lipidmetabolismus und Atherosklerose im Rahmen einer Adipositas untersucht werden sollte, wurden die C57BL/6 Mäuse als ein erstes Tiermodell gewählt, um den Effekt von Chemerin auf die verschiedenen Parameter untersuchen zu können. Die LDLR-KO Mäuse stellen ein komplementäres Mausmodell dar, um den Glukose- und Lipidmetabolismus im Rahmen einer Überernährung zu untersuchen. Zusätzlich eignen sie sich, um Atherosklerose zu untersuchen. Um den Effekt von Chemerin auf den Glukosemetabolismus untersuchen zu können, eignen sich alternativ genetische Mausmodelle, wie die Leptin-defiziente (ob/ob) oder die Leptinrezeptor-defiziente (db/db) Maus. Diese Mausmodelle weisen bei ausgeprägter Adipositas eine ausgeprägte diabetische Stoffwechsellage auf und stellen deshalb Diabetesstandardmausmodelle dar. In der vorliegenden Arbeit wurden bewusst diätinduzierte Mausmodelle der Insulinresistenz untersucht, um zu gewährleisten, dass ein Chemerin-induzierter milder Phänotyp detektiert werden kann und nicht durch die ausgeprägte diabetische Stoffwechsellage im ob/ob- oder db/db-Mausmodell überdeckt wird.

Basierend auf den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit sind nun weitere Studien zur Rolle von Chemerin im Glukosestoffwechsel nötig, um die Fragen nach den molekularen Vorgängen im diabetischen Mausmodell zu klären.

Zur Untersuchung der Funktion eines Proteins wird in der Regel ein Tiermodell verwendet, in dem ein Gen-knock-out (KO) für das zu untersuchende Protein vorliegt. So können Effekte eines Verlusts des Gens auf den Phänotyp untersucht werden. Ein solches KO-Modell zu etablieren ist zeit- und kostenintensiv, wenn das KO-Modell nicht bereits kommerziell zu erwerben ist. Viele Verpaarungen und Genanalysen sind notwendig, um eine reine KO-Linie zu erhalten, mit der eine Zucht aufgebaut werden kann. Gleiches gilt für die Etablierung einer Zuchtlinie von transgenen Mäusen, die das zu untersuchende Gen besitzen und exprimieren, um so den Effekt einer Expression des Gens auf den Metabolismus zu untersuchen.

Wir haben uns deshalb für unsere Studie für die Expression des Transgens Chemerin mit Hilfe eines AAV-Expressionssystems entschieden, um die Effekte des Proteins auf den Metabolismus zu untersuchen. AAV gewährleisten eine langanhaltende physiologische Expression des Transgens, da die AAVs nur zu einem sehr geringen Prozentsatz in das Wirtsgenom integrieren, zu 99,5% liegt der Vektor mit dem kodierenden Transgen episomal, d. h. extrachromosomal, in den Wirtszellen vor. Da sie nicht humanpathogen sind stellen sie ein relativ sicheres Expressionssystem dar und sind im Vergleich zur Züchtung und Haltung von KO- oder transgenen Mäusen kostengünstiger. Verglichen mit adenoviralen Expressionssystemen rufen AAVs eine deutlich geringere Immunantwort in den Tieren hervor. Dies ist ein wichtiger Aspekt, da in den Tieren der Einfluss von Chemerin auf Glukose-, Lipidmetabolismus und auch Atherosklerose, die unter anderem durch inflammatorische Prozesse beeinflusst werden, untersucht werden sollte.

So konnte bei den C57BL/6 Mäusen auch 21 Wochen nach der Virusinjektion eine hohe Expression von Chemerin im Serum der Tiere gemessen werden. Bei AAVs handelt es sich um ssDNA-Viren, bei denen die Expression des Transgens nach Applikation verzögert eintritt, so dass es erst nach ca. 3-4 Wochen zu einer stabilen Expression des Transgens kommt. Zusammenfassend kann man sagen, dass das AAV-Vektorsystem ein sicheres und mit stabiler Expression verbundenes Expressionssystem darstellt, weshalb es auch für die hier durchgeführten Studien gewählt wurde.

Um eine leberspezifische Expression des Hepatoadipokins Chemerin in den Mäusen zu gewährleisten wurden das AAV2.8 mit dem leberspezifischen TBG-Promotor verwendet. Die Kombination mit dem Kapsid des AAV8 bietet den Vorteil, dass die Vektoren zielgerichtet in die Gewebe gelangen, denn AAV8 ist hoch leberspezifisch mit einer großen Gentransduktionsrate in die Leber von Mäusen [165-166] und die Kombination Expressionsplasmid mit dem leberspezifischen Promotor sollte eine Expression des Transgens ausschließlich in der Leber sicherstellen [169].

Nach der Applikation des AAVs über Schwanzveneninjektion wurde überprüft, ob das AAV-Vektorsystem auch funktionsfähig war, d. h. ob Chemerin in der Leber der Tiere exprimiert wurde. Nach Versuchsende wurde die relative mRNA-Expression von Chemerin in den mit AAV.Chemerin injizierten Tieren im Vergleich zu den Kontrolltieren verglichen. Sowohl in C57BL/6 als auch LDLR-KO Mäusen wurde eine hohe Expression von Chemerin-mRNA in der mit AAV.Chemerin injizierten Gruppe gemessen. In beiden Modellen wurde das AAV-Expressionsplasmid wie gewünscht in der Leber exprimiert. In den LDLR-KO Mäusen wurden zusätzlich nach einer möglichen mRNA-Expression von Chemerin im gonadalen Fettgewebe, der Skelettmuskulatur und den Carotiden geschaut. Das Expressionsplasmid besitzt einen leberspezifischen TBG-Promotor, um die Expression von Chemerin in der Leber zu gewährleisten. Da es sich bei Chemerin um ein Hepatoadipokin handelt [92] und auch in anderen Geweben wie Fettgewebe und Lunge exprimiert [92]. Bei den mit AAV.Chemerin injizierten LDLR-KO Mäusen wurde neben der mRNA Expression in der Leber eine mRNA Expression von Chemerin im gonadalen Fettgewebe gezeigt. Da die AAV Partikel über Schwanzveneninjektion in die Tiere gebracht wurden, gelangen sie nicht nur in die Leber, sondern mit dem Blutstrom auch in andere Gewebe, die sie so infizieren können. Allerdings sollte durch das AAV2.8-Konstrukt und den leberspezifischen TBG-Promotor sichergestellt werden, dass das Transgen nicht in anderen Geweben exprimiert wird. Nicht zu erwarten war deshalb eine Expression von Chemerin im gonadalen Fettgewebe der Tiere. Es ist nicht auszuschließen, dass der TBG-Promotor „leaky“ ist, d. h. er auf einem niedrigen Niveau die mRNA Transkription des Transgens fördert, obwohl dieser eigentlich nicht induziert ist. Dieses Phänomen ist für verschiedene Promotoren beschrieben. Dies könnte dafür sorgen, dass humanes Chemerin trotz eines leberspezifischen Promotors im Fettgewebe der Tiere exprimiert wird.

Bei Chemerin handelt es sich um ein sezerniertes Protein, das auch natürlicherweise in Leber und Fettgewebe exprimiert wird. Es handelt sich um ein sogenanntes Hepatoadipokin. Somit können die systemischen Effekte des Proteins auch weiterhin in unserem Mausmodell gut beurteilt werden. Wir konnten zeigen, dass die unerwartete Expression des Transgens im gonadalen Fettgewebe keinen Einfluss auf die Insulinresistenz im gonadalen Fettgewebe hat.

Chemerin konnte einfach im Serum der Mäuse gemessen werden. Hierfür wurde zunächst eine Immunoblotanalyse mit einem human spezifischen AK für Chemerin im Serum der C57BL/6 und LDLR-KO Mäuse durchgeführt. Nur im Serum der mit AAV.Chemerin injizierten Tiere konnte das Protein nachgewiesen werden. Bei den Kontrolltieren wurde die LacZ-Expression histologisch mit einer LacZ-Färbung nachgewiesen. Somit war sichergestellt, dass eine AAV vermittelte Expression des Transgens Chemerin in den Mäusen stattfand.

Das sezernierte Prochemerin wird extrazellulär verschiedenen Prozessierungsschritten unterzogen, um seine volle biologische Aktivität zu erlangen. Es wird durch verschiedene Proteasen der Koagulations-, Fibrinolytischen- und Inflammatorischenkaskade durch proteolytische Spaltung am

C-Terminus zu pro- oder antiinflammatorisch wirksamen oder inaktivem Chemerin prozessiert [95, 103, 106, 205-206]. Es war nicht möglich im Rahmen dieser Studie festzustellen, welche Form von Chemerin im Serum der Tiere vorliegt. Der Grund hierfür ist die fehlende Spezifität der verwendeten AK zur Detektion von humanem und auch murinem Chemerin im Immunoblot und ELISA-Test. Der humane Chemerin AK erkennt spezifisch eine Region im Bereich der AS21-157, also einem Bereich des Proteins, der nicht der Prozessierung durch Serumproteasen unterworfen ist. Deshalb kann nur eine Aussage über den Anteil von Gesamtchemerin im Serum der Tiere gemacht werden und keine Unterscheidung der prozessierten Chemerin Formen.

Um die Konzentration von Chemerin zu verschiedenen Zeitpunkten des Versuchs im Serum der Mäuse zu messen, wurde ein Chemerin spezifischer ELISA-Test verwendet. Sowohl bei den C57BL/6 als auch den LDLR-KO Mäusen konnte ein zeitabhängiger Verlauf der Chemerinexpression gezeigt werden. Die Konzentration von Chemerin im Serum der AAV.Chemerin injizierten Tiere nahm von Woche zu Woche zu, bis jeweils nach 16 Wochen ein maximaler Serum-Chemerinspiegel erreicht war, der mit dem Serumspiegel gesunder Probanden vergleichbar war.

Bei den mit AAV.Chemerin injizierten C57BL/6 Tieren kam es nach 21 Wochen zu einem Abfall der Serum-Chemerinkonzentration. Weshalb es zu diesem Zeitpunkt zu einem Abfall der Expression kam ist unklar, da sich an den Versuchsbedingungen in diesem Zeitraum nicht geändert hatte. Nicht auszuschließen ist, dass nach diesem langen Versuchszeitraum von 21 Wochen, die episomal vorliegende Plasmid-DNA von den Zellen abgebaut oder sie bei Zellteilungen zum Teil verloren gegangen war und deshalb die Konzentration des Proteins durch eine verminderte Expression absank. Um auszuschließen, dass die hohe Expression des humanen Chemerin die Expression des murinen Chemerin in irgendeiner Weise beeinflussten, wurde sowohl die mRNA-Expression als auch die Konzentration des murinen Chemerin im Serum gemessen. Die Expression des humanen Proteins hatte keinen Einfluss auf die Expression des murinen Proteins auf mRNA- und Proteinebene.

Lungsay et al zeigten, dass sowohl humanes als auch murines Chemerin den murinen Chemerinrezeptor *cmklr1* aktivieren [117]. Humanes und murines Chemerin weisen eine AS-Homologie von 63% auf. Die verschiedenen Formen von Chemerin zeigen unterschiedliche biologische Aktivität, was die Interpretation der Ergebnisse erschwert. Wir wissen nicht, ob die Expression von Chemerin die Proteolyse von murinem und/oder humanem Chemerin und somit deren Bioaktivität am Rezeptor verändert.

Klinische Studien haben in den letzten Jahren belegt, dass Serum-Chemerinspiegel mit einem erhöhten Körpergewicht assoziiert sind [88, 90, 93, 124, 139]. Aus diesem Grund wurde während des gesamten Versuchszeitraums die Gewichtszunahme der Tiere in regelmäßigen Abständen kontrolliert, um festzustellen welchen Einfluss Chemerin auf das Gewicht der Tiere hatte. Weder bei den C57BL/6 Mäusen auf ND oder HFD noch bei den LDLR-KO Mäusen auf HFD konnte im Zeitverlauf ein Unterschied

in der Gewichtszunahme zwischen den Chemerin exprimierenden Tieren und den Kontrolltieren beobachtet werden. Wir konnten jedoch mit unseren Nachweismethoden nur das Gesamtchemerin messen und keine Unterscheidung zwischen den prozessierten Formen machen. Daher kann nicht ausgeschlossen werden, dass Chemerin keinen Einfluss auf das Gewicht hat. Zusammenfassend kann nur geschlussfolgert werden, dass in unserem Versuchsaufbau das Gesamtchemerin keinen Einfluss auf das Körpergewicht hat.

Die Beobachtungen aus den bisherigen klinischen Studien, dass Chemerin mit dem Körpergewicht korreliert, konnte nicht bestätigt werden. Die Frage ist, ob diätinduzierte Adipositas-Modelle wie C57BL/6 und LDLR-KO Mäuse geeignete Modelle darstellen, um den Effekt von Chemerin auf das Körpergewicht zu untersuchen. Für Adipositasstudien gibt es alternative genetische Mausmodelle, die man auf eine Assoziation zwischen erhöhten Serum-Chemerinspiegel und dem Körpergewicht hin untersuchen könnte. Ein geeignetes Mausmodell für solche Untersuchungen wäre z. B. die ob/ob oder die db/db Maus, die häufig für Studien zur Untersuchung von Adipositas und T2DM genutzt werden [31]. Allerdings besteht bei einem genetischen Mausmodell immer das Risiko, dass der Phänotyp des Gendefekts so stark ausgeprägt ist, dass der Einfluss des zu untersuchenden Proteins überdeckt wird und man keinen Effekt mehr sieht.

In vitro-Studien lieferten in der Vergangenheit widersprüchliche Daten zum Effekt von Chemerin auf den Glukosemetabolismus. Takahashi et al. [128] zeigten eine durch Chemerin verbesserte Insulin-stimulierte Glukoseaufnahme in 3T3-L1 Adipozyten wohingegen Kralisch et al. [132] eine verminderte Glukoseaufnahme nach Insulinstimulation in 3T3-L1 Adipozyten sahen. Sell et al. [138] zeigten in Skelettmuskelzellen eine verminderte Glukoseaufnahme nach Insulinstimulation und Ernst et.al [129] untersuchten den Effekt von Chemerin durch eine einmalige Injektion des Proteins *in vivo* in ob/ob, db/db Mäusen und einem Diet-Induced-Obesity (DIO) Modell. Sie fanden eine durch Chemerin verschlechterte Glukosetoleranz und gesenkte Insulinspiegel in ob/ob und db/db Mäusen. In den DIO Tieren zeigte sich ebenfalls eine verschlechterte Glukosetoleranz während des GTTs, jedoch keine verminderten Insulinspiegel. Im Gegensatz zu dem Versuch von Ernst et al., in dem ein akuter Zustand untersucht wurde, spiegelt unser Versuch die chronische Chemerinexpression, wie sie bei einem Menschen mit MetS vorzuliegen scheint, wider. Aufgrund der *in vivo* Daten von Ernst et al. [129] war in den Chemerin-exprimierenden C57BL/6 und LDLR-KO Mäusen ebenfalls das Auftreten einer verschlechterten Glukosetoleranz zu erwarten. Um den Effekt der Chemerinexpression auf den Glukosemetabolismus zu untersuchen, wurde nach zehn Wochen auf HFD bei den C57BL/6 Tieren ein ipGTT durchgeführt. Bei den Chemerin-exprimierenden Tieren ließen sich tendenziell höhere Blutzuckerwerte verglichen mit den Kontrolltieren feststellen. In den LDLR-KO Tieren fanden sich signifikant höhere Blutglukosewerte als bei den Kontrolltieren. Ein Grund, warum die Werte bei den LDLR-KO Mäusen signifikant unterschiedlich waren und bei den C57BL/6 nicht, könnte sein, dass der

ipGTT bei den C57BL/6 Tieren etwas früher durchgeführt wurde. Die Tiere entwickeln nach ca. 10-wöchiger HFD eine Insulinresistenz. Allerdings verschlechterte sich diese im Laufe der Zeit noch weiter, so dass ein ipGTT zu einem späteren Zeitpunkt auch hier signifikant unterschiedliche Werte zwischen der Chemerin-exprimierenden Gruppe und der Kontrollgruppe hätte liefern können. Die Tendenz zu höheren Blutzuckerwerten war jedoch schon erkennbar. Ein weiterer Grund könnte auch die schwere Dyslipidämie sowie die Inflammation in den LDLRKO-Mäusen sein, da diese Faktoren zusätzlich die Entstehung einer Insulinresistenz in den Tieren begünstigen.

Um zu sehen, ob die tendenziell höheren Blutzuckerwerte in der Chemerin-exprimierenden Gruppe durch eine verminderte Insulinsekretion hervorgerufen wurden, wurden vor Beginn des ipGTT und 30 min nach Glukoseinjektion Insulin im Serum bestimmt. In beiden Mausmodellen zeigte sich in der Chemerin exprimierenden Gruppe 30 min nach Glukoseinjektion kein signifikanter Unterschied in der Insulinsekretion verglichen mit der Kontrollgruppe. Ernst et al. haben in ihrem DIO-Mausmodell gezeigt, dass eine akute Gabe von Chemerin zu einer verschlechterten Glukosetoleranz führt, konnten jedoch keinen Effekt auf die Insulinsekretion nachweisen [129]. Wir konnten hier ergänzend zeigen, dass eine chronische Expression von Chemerin über einen langen Zeitraum in einem durch HFD induzierten Mausmodell zu einer verschlechterten Glukosetoleranz führt, ohne die Insulinsekretion zu beeinflussen.

Da keine verminderten Insulinspiegel gemessen wurden, die die verschlechterte Glukosetoleranz erklären würden, wurde in den LDLR-KO Tieren ein ipITT durchgeführt, um die Hypothese zu testen, dass eine Insulinresistenz in den Chemerin exprimierenden Tieren bestand. Hier zeigte die Chemerin exprimierende Gruppe nach Insulininjektion einen deutlich geringeren Abfall der Blutglukose im Vergleich zur Kontrollgruppe. Die Expression von Chemerin führte in LDLR-KO Mäusen auf HFD zu einer systemischen Insulinresistenz.

Der Goldstandard zur Beurteilung der Insulinsekretion und um die Insulinresistenz zu bestimmen wären aber der hyperglykämische und hyperinsulinämisch-euglykämische Clamp. Dabei handelt es sich um eine kombinierte Insulin-Glukose-Infusionstechnik, die den Vorteil hat, dass mögliche Störeinflüsse durch hypoglykämische Gegenreaktionen, endogene Insulinreaktion oder Hyperglykämie verhindert werden. Bei der Durchführung des Clamp kann es immer zu Problemen bei der Versuchsdurchführung und Messung kommen. Der ipGTT und der ipITT sind einfacher durchzuführen und störende Einflüsse von außen haben einen geringeren Einfluss auf die Messwerte, was die Messungen relativ stabil macht. Die Werte sind zwar ungenauer als bei einem Clamp, aber die Methode einfacher anzuwenden. Die Clamp-Technik ist sehr aufwendig und war im Rahmen dieser Studie nicht durchführbar. Deshalb haben wir uns im Rahmen der Studie für den etablierten und einfacher durchführbaren GTT und ITT entschieden. Doch weitere Untersuchungen, inklusive eines Clamp-Versuchs, sind sicherlich nötig, um die Effekte von Chemerin auf den Glukosemetabolismus detaillierter zu untersuchen und die zugrunde liegenden Mechanismen aufzuklären.

Sell et al. [138] konnten *in vitro* zeigen, dass Chemerin eine Insulinresistenz in Skelettmuskelzellen verursacht und sie identifizierten eine durch Chemerin vermittelte Aktivierung der p38 MAP Kinase, ERK-1/2 sowie NF- κ B, als möglichen zugrunde liegenden Mechanismus. Nachdem in den Chemerin-exprimierenden LDLR-KO Mäusen eine systemische Insulinresistenz durch den ipITT aufgezeigt werden konnte, war aufgrund der Ergebnisse von Sell et al. davon auszugehen, dass die Tiere eine Insulinresistenz in der Skelettmuskulatur entwickelt hatten. Deshalb wurde in den C57BL/6 und den LDLR-KO Mäusen die Aktivierung des Insulinsignalwegs und des AMPK-Signalwegs in verschiedenen Geweben untersucht. Hierfür wurden die für den Glukosemetabolismus wichtigen Organe Leber, Skelettmuskulatur und gonadales Fettgewebe mit Hilfe der Immunoblotanalyse auf die Aktivierung von Akt1 und AMPK- α hin untersucht.

Bei diskret erhöhten Blutglukosewerten im ipGTT in den C57BL/6 Tieren ergab die Immunoblotanalyse keinen Unterschied in der Phosphorylierung von Akt1 und AMPK- α in Leber, Skelettmuskulatur oder gonadalem Fettgewebe, zwischen der Chemerin-exprimierenden Gruppe und der Kontrollgruppe. Limitiert wird die Western-Blot-Analyse durch ihre fehlende Sensitivität. Geringe Unterschiede in der Phosphorylierung können mit dieser Methode, aufgrund der hohen Proteinkonzentration, die für die Analyse notwendig sind, oft nicht dargestellt werden.

Im Gegensatz dazu zeigte sich in den LDLR-KO Mäusen bei signifikant erhöhten Blutglukosewerten im ipGTT im Skelettmuskel der Chemerin-exprimierenden LDLR-KO Tiere eine deutliche Inhibierung der Phosphorylierung von Akt1 und AMPK- α . Die im ipGTT und ipITT gemessene verschlechterte Glukosetoleranz der Chemerin-exprimierenden LDLR-KO Mäuse resultierte somit aus einer Insulinresistenz in der Skelettmuskulatur der Tiere. In der Leber und im gonadalen Fettgewebe zeigten sich auch hier keine Unterschiede in der Insulin stimulierten Phosphorylierung von Akt1 und der AMPK- α Aktivierung.

Da mittels Western-Blot und ELISA nur das Gesamtchemerin gemessen werden konnte und so eine Unterscheidung der prozessierten Chemerinformen nicht möglich war, kann man schlussfolgern, dass die Erhöhung des Gesamtchemerins von humanem und murinem Chemerin in einer Glukoseintoleranz in C57BL/6 und LDLR-KO Mäusen sowie einer Insulinresistenz im Skelettmuskel von LDLR-KO Mäusen auf HFD resultiert. Denkbar wäre allerdings auch, dass die Expression des humanen Chemerin die enzymatische Proteolyse des humanen und murinen Chemerins und dadurch auch die biologische Aktivität von Chemerin verändert. Weitere Untersuchungen unter Verwendung aufwendiger Methoden, wie Massenspektrometrie, könnten hier weitere Aufschlüsse geben.

Im Gegensatz zu den Daten aus klinischen Studien [88, 93, 97, 139] konnten im Verlauf der hier durchgeführten Studie weder in C57BL/6 noch LDLR-KO Mäusen auf HFD signifikanten Effekte von Chemerin auf die TG und HDL-C, gezeigt werden. C57BL/6 Mäuse entwickeln auf HFD Übergewicht, Insulinresistenz und zeigen eine moderate Hyperglykämie. Sie stellen das klassische Mausmodell zur

Beurteilung des HDL-Metabolismus dar. LDLR-KO Mäusen fehlt das LDL-Rezeptor Gen. Deshalb entwickeln sie einen Phänotyp, der beim Menschen bei der familiären Hypercholesterinämie gefunden wird [199-200]. Sie zeigen auf einer HFD zudem eine ausgeprägte Hypertriglyceridämie, haben leicht erhöhte Blutglukosewerte und entwickeln Atherosklerose. Allerdings besitzen Mäuse anders als Menschen kein CETP (Cholesterinester-Transferprotein). CETP ist ein Transferprotein, das am reversen Cholesterintransport, also am Rücktransport von Cholesterin aus der Peripherie zur Leber, beteiligt ist. Es transferiert TG von VLDL-Partikeln auf HDL-Partikel und Cholesterinester von HDL-Partikeln zu ApoB haltigen Partikeln (wie LDL). Hier stellt sich das Problem, dass die Wechselwirkungen zwischen ApoB haltigen Partikeln und HDL-Partikeln nicht beurteilt werden können. Ein Mausmodell, das dem humanen Lipidphänotyp eher entspricht und in dem diese Wechselwirkungen besser zu untersuchen sind, sind die APOE*3Leiden transgenen Mäuse. Diese Mäuse besitzen eine Mutation im ApoE-Gen und entwickeln auf cholesterolreicher Diät einen hyperlipidämischen Phänotyp (erhöhtes Plasmacholesterol, LDL und VLDL), hervorgerufen durch verminderten ApoE-Lipoproteinabbau. Die Tiere entwickeln so eine Atherosklerose, die den Charakteristika der humanen Plaquebildung und Plaquemorphologie entspricht [201].

Atherosklerose ist ein Krankheitsbild, an deren Entstehung komplexe Vorgänge beteiligt sind. Risikofaktoren für die Entstehung von Atherosklerose sind Übergewicht, erhöhter Blutdruck, Dyslipoproteinämie und T2DM [207-209]. Inflammatorische Vorgänge spielen ebenfalls eine Rolle bei der Atheroskleroseentstehung [210]. Es ist bekannt, dass Chemerin die Migration und Aktivierung von Immunzellen *in vitro* beeinflusst [92, 101, 211] und eine Rolle bei Entzündungsreaktionen *in vivo*, z. B. bei entzündlichen Hauterkrankungen [204, 212-214] und in Mausmodellen für entzündliche Lungenerkrankungen [117], spielt.

Deshalb wurde der Effekt von Chemerin auf Atherosklerose in LDLR-KO Mäusen auf HFD untersucht. Chemerin zeigte in den Chemerin exprimierenden LDLR-KO Mäusen keinen Effekt auf Atherosklerose im Vergleich zu den Kontrollmäusen. Die Effekte von Chemerin auf inflammatorische Vorgänge scheinen keinen Einfluss auf das Ausmaß der Atherosklerose in LDLR-KO Mäusen zu haben. Bei der Auswertung der LDLR-KO Mäuse wurde lediglich das Ausmaß der atherosklerotischen Plaques pro Gesamtaorta bestimmt, jedoch keine histologischen Untersuchungen zur Plaquesmorphologie angestellt. Genauere Untersuchungen zur Zusammensetzung der Plaques sind jedoch nötig, um festzustellen, ob Chemerin einen Effekt auf die frühe Plaqueentwicklung bzw. die Plaquemorphologie hat. Bei Patienten, die aufgrund chronischer Angina pectoris-Beschwerden eine CT-Angiographie zur Beurteilung der Koronargefäße erhielten, war Chemerin jedoch nicht mit der Plaquemorphologie assoziiert [88].

Zusammenfassend war das Ziel der hier vorliegenden Arbeit, die Rolle von Chemerin auf Gewicht, Glukose- und Lipidmetabolismus sowie Atherosklerose *in vivo* zu untersuchen. Wir konnten zeigen, dass

die Expression von humanem Chemerin diskret erhöhte Blutglukosewerte in C57BL/6 Mäusen auf HFD und eine pathologische Glukosetoleranz mit muskulärer Insulinresistenz in LDLR-KO Mäusen auf HFD induziert. Die Expression von Chemerin hatte jedoch keinen Einfluss auf Gewicht, Serumlipide und Atherosklerose in LDLR-KO Mäusen.

Chemerin wurde in unserem Versuch sowohl in der Leber als auch im gonadalen Fettgewebe exprimiert. Aus den bisher bekannten Daten ergeben sich eine Vielzahl von Fragen, die zukünftig zu klären sind:

- Welche prozessierten Formen von Chemerin sind in verschiedenen Geweben vorhanden und wie sind sie mit den pro- und antiinflammatorischen Wirkungen von Chemerin verknüpft?
- Wie ist das systemische Verhältnis von Chemerin aus Leber und Fettgewebe und wie verändert es sich mit zunehmender Adipositas und metabolischen Veränderungen?
- Wie genau beeinflussen die prozessierten Formen von Chemerin die metabolischen Funktionen des Glukose- und Lipidstoffwechsels und der Insulinsensitivität in verschiedenen Geweben?
- Was sind die intrazellulären Signalmechanismen der Chemerinrezeptoren?
- Welche Funktionen haben die verschiedenen Chemerinrezeptoren, CMKLR1, GPR1 und CCRL2?

Viele dieser Fragen bleiben heute noch unbeantwortet und es bedarf weiterer Experimente, um alle Antworten zu finden. Eines wird jedoch deutlich, Chemerin spielt eine Rolle in verschiedenen Aspekten der humanen Pathophysiologie der Adipositas, Inflammation und Insulinresistenz. Wir konnten zeigen, dass Chemerin eine Rolle bei der Entstehung von Insulinresistenz im Skelettmuskel und in seiner Konsequenz von T2DM im Rahmen einer HFD spielt. Zukünftige Studien von Chemerin und dem Chemerinrezeptor, CMKLR1, werden Aufschluss über die molekularen Mechanismen geben und Wege für neue potentielle therapeutische Ziele bei der Behandlung von metabolischen Erkrankungen wie DM und Adipositas aufzeigen.

6 Literaturverzeichnis

1. Kylin, E., *Hypertonie-Hyperglykämie-Hyperurikämiesyndrome*. Zentralblatt für innere Medizin, 1923. **44**.
 2. Vague, J., *Sexual differentiation. A determinant factor of the forms of obesity*. 1947. *Obes Res*, 1996. **4**(2): p. 201-3.
 3. Hanefeld, M. and W. Leonhardt, *Das Metabolische Syndrom*. Dt Gesundh Wesen, 1981. **34**: p. 545-551.
 4. Reaven, G.M., *Role of Insulin Resistance in Human Disease (Syndrome X): An Expanded Definition*. Annual Review of Medicine, 1993. **44**(1): p. 121-131.
 5. DeFronzo, R.A., *Insulin resistance: a multifaceted syndrome responsible for NIDDM, obesity, hypertension, dyslipidaemia and atherosclerosis*. *Neth J Med*, 1997. **50**(5): p. 191-7.
 6. Kaplan, N.M., *The deadly quartet. Upper-body obesity, glucose intolerance, hypertriglyceridemia, and hypertension*. *Arch Intern Med*, 1989. **149**(7): p. 1514-20.
 7. *Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications.*, in *Report of a WHO consultation*. 1999, World Health Organization: Geneva.
 8. Expert Panel on Detection, E. and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults, *Executive Summary of the Third Report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III)*. *JAMA*, 2001. **285**(19): p. 2486-2497.
 9. IDF, *The IDF consensus worldwide definition of the metabolic syndrome*. 2004, International Diabetes Federation.
 10. Alberti, K.G., et al., *Harmonizing the metabolic syndrome: a joint interim statement of the International Diabetes Federation Task Force on Epidemiology and Prevention; National Heart, Lung, and Blood Institute; American Heart Association; World Heart Federation; International Atherosclerosis Society; and International Association for the Study of Obesity*. *Circulation*, 2009. **120**(16): p. 1640-5.
 11. Assmann, G., et al., *Harmonizing the definition of the metabolic syndrome: comparison of the criteria of the Adult Treatment Panel III and the International Diabetes Federation in United States American and European populations*. *Am J Cardiol*, 2007. **99**(4): p. 541-8.
 12. *Obesity: preventing and managing the global epidemic. Report of a WHO consultation*. World Health Organ Tech Rep Ser, 2000. **894**: p. i-xii, 1-253.
 13. Helmert, U. and H. Strube, *Die Entwicklung der Adipositas in Deutschland im Zeitraum von 1985 bis 2002*. *Gesundheitswesen*, 2004. **66**(07): p. 409,415.
 14. Hauner, H., et al., *Übergewicht, Adipositas und erhöhter Taillenumfang: Regionale Prävalenzunterschiede in der hausärztlichen Versorgung*. *Dtsch Arztebl*, 2008. **105**(48): p. 827-33.
 15. Calle, E.E., L.R. Teras, and M.J. Thun, *Obesity and Mortality*. *New England Journal of Medicine*, 2005. **353**(20): p. 2197-2199.
 16. Lenz, M., T. Richter, and I. Mühlhauser, *Morbidität und Mortalität bei Übergewicht und Adipositas im Erwachsenenalter: Eine systematische Übersicht*. *Dtsch Arztebl*, 2009. **106**(40): p. 641-8.
 17. Pischon, T., et al., *General and Abdominal Adiposity and Risk of Death in Europe*. *New England Journal of Medicine*, 2008. **359**(20): p. 2105-2120.
-

18. Folsom, A.R., et al., *Body fat distribution and 5-year risk of death in older women*. JAMA, 1993. **269**(4): p. 483-7.
 19. Ohlson, L.O., et al., *The influence of body fat distribution on the incidence of diabetes mellitus. 13.5 years of follow-up of the participants in the study of men born in 1913*. Diabetes, 1985. **34**(10): p. 1055-8.
 20. <http://www.adipositas-gesellschaft.de/>.
 21. Ritchie, S.A., et al., *The role of insulin and the adipocytokines in regulation of vascular endothelial function*. Clin Sci (Lond), 2004. **107**(6): p. 519-32.
 22. Gualillo, O., J.R. Gonzalez-Juanatey, and F. Lago, *The emerging role of adipokines as mediators of cardiovascular function: physiologic and clinical perspectives*. Trends Cardiovasc Med, 2007. **17**(8): p. 275-83.
 23. Pittas, A.G., N.A. Joseph, and A.S. Greenberg, *Adipocytokines and insulin resistance*. J Clin Endocrinol Metab, 2004. **89**(2): p. 447-52.
 24. Hutley, L. and J.B. Prins, *Fat as an endocrine organ: relationship to the metabolic syndrome*. Am J Med Sci, 2005. **330**(6): p. 280-9.
 25. Combs, T.P., et al., *A transgenic mouse with a deletion in the collagenous domain of adiponectin displays elevated circulating adiponectin and improved insulin sensitivity*. Endocrinology, 2004. **145**(1): p. 367-83.
 26. Okamoto, M., et al., *Adiponectin induces insulin secretion in vitro and in vivo at a low glucose concentration*. Diabetologia, 2008. **51**(5): p. 827-35.
 27. Kubota, N., et al., *Adiponectin stimulates AMP-activated protein kinase in the hypothalamus and increases food intake*. Cell Metab, 2007. **6**(1): p. 55-68.
 28. Kantartzis, K., et al., *The association between plasma adiponectin and insulin sensitivity in humans depends on obesity*. Obes Res, 2005. **13**(10): p. 1683-91.
 29. Tschritter, O., et al., *Plasma adiponectin concentrations predict insulin sensitivity of both glucose and lipid metabolism*. Diabetes, 2003. **52**(2): p. 239-43.
 30. Weyer, C., et al., *Hypoadiponectinemia in obesity and type 2 diabetes: close association with insulin resistance and hyperinsulinemia*. J Clin Endocrinol Metab, 2001. **86**(5): p. 1930-5.
 31. Friedman, J.M. and J.L. Halaas, *Leptin and the regulation of body weight in mammals*. Nature, 1998. **395**(6704): p. 763-70.
 32. Steppan, C.M., et al., *The hormone resistin links obesity to diabetes*. Nature, 2001. **409**(6818): p. 307-12.
 33. Hotamisligil, G.S., N.S. Shargill, and B.M. Spiegelman, *Adipose expression of tumor necrosis factor-alpha: direct role in obesity-linked insulin resistance*. Science, 1993. **259**(5091): p. 87-91.
 34. Kern, P.A., et al., *Adipose tissue tumor necrosis factor and interleukin-6 expression in human obesity and insulin resistance*. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2001. **280**(5): p. E745-51.
 35. Schaffer, J.E., *Lipotoxicity: when tissues overeat*. Curr Opin Lipidol, 2003. **14**(3): p. 281-7.
 36. Boden, G., *Fatty acid-induced inflammation and insulin resistance in skeletal muscle and liver*. Curr Diab Rep, 2006. **6**(3): p. 177-81.
 37. Cymet, T., *Genetics of cardiovascular disease*. Compr Ther, 2010. **36**: p. 18-9.
 38. Ferrannini, E., et al., *Insulin resistance in essential hypertension*. N Engl J Med, 1987. **317**(6): p. 350-7.
 39. Geiß, C. and K.G. Parhofer, *In: Handbuch der Fettstoffwechselstörungen*, ed. P. Schwandt and K.G. Parhofer. 2007: Schattauer Verlag.
-

40. *UK Prospective Diabetes Study (UKPDS). XI: Biochemical risk factors in type 2 diabetic patients at diagnosis compared with age-matched normal subjects.* Diabet Med, 1994. **11**(6): p. 534-44.
 41. Austin, M.A., et al., *Atherogenic lipoprotein phenotype. A proposed genetic marker for coronary heart disease risk.* Circulation, 1990. **82**(2): p. 495-506.
 42. Lahdenpera, S., et al., *Regulation of low-density lipoprotein particle size distribution in NIDDM and coronary disease: importance of serum triglycerides.* Diabetologia, 1996. **39**(4): p. 453-61.
 43. Packard, C.J., *Triacylglycerol-rich lipoproteins and the generation of small, dense low-density lipoprotein.* Biochem Soc Trans, 2003. **31**(Pt 5): p. 1066-9.
 44. Castelli, W.P., *Epidemiology of coronary heart disease: the Framingham study.* Am J Med, 1984. **76**(2A): p. 4-12.
 45. Kannel, W.B., *Lipids, diabetes, and coronary heart disease: insights from the Framingham Study.* Am Heart J, 1985. **110**(5): p. 1100-7.
 46. Kullo, I.J., D.D. Hensrud, and T.G. Allison, *Comparison of numbers of circulating blood monocytes in men grouped by body mass index (<25, 25 to <30, > or =30).* Am J Cardiol, 2002. **89**(12): p. 1441-3.
 47. Takahashi, K., et al., *Adiposity elevates plasma MCP-1 levels leading to the increased CD11b-positive monocytes in mice.* J Biol Chem, 2003. **278**(47): p. 46654-60.
 48. Yamagishi, S.I., et al., *Leptin induces mitochondrial superoxide production and monocyte chemoattractant protein-1 expression in aortic endothelial cells by increasing fatty acid oxidation via protein kinase A.* J Biol Chem, 2001. **276**(27): p. 25096-100.
 49. *Todesursachenstatistik.* 2010, Gesundheitsberichterstattung des Bundes.
 50. Chitturi, S., et al., *NASH and insulin resistance: Insulin hypersecretion and specific association with the insulin resistance syndrome.* Hepatology, 2002. **35**(2): p. 373-9.
 51. Pagano, G., et al., *Nonalcoholic steatohepatitis, insulin resistance, and metabolic syndrome: further evidence for an etiologic association.* Hepatology, 2002. **35**(2): p. 367-72.
 52. Marchesini, G. and G. Forlani, *NASH: from liver diseases to metabolic disorders and back to clinical hepatology.* Hepatology, 2002. **35**(2): p. 497-9.
 53. <http://www.profi.diabetesde.org/gesundheitsbericht/2011>.
 54. Stumvoll, M., B.J. Goldstein, and T.W. van Haeften, *Type 2 diabetes: principles of pathogenesis and therapy.* Lancet, 2005. **365**(9467): p. 1333-46.
 55. IDF, *THE GLOBAL BURDEN, in Global Burden: Prevalence and Projections, 2010 and 2030.* 2010.
 56. Eckel, R.H., *Lipoprotein lipase. A multifunctional enzyme relevant to common metabolic diseases.* N Engl J Med, 1989. **320**(16): p. 1060-8.
 57. Rabe, K., et al., *Adipokines and insulin resistance.* Mol Med, 2008. **14**(11-12): p. 741-51.
 58. Rubin, R. and R. Baserga, *Insulin-like growth factor-I receptor. Its role in cell proliferation, apoptosis, and tumorigenicity.* Lab Invest, 1995. **73**(3): p. 311-31.
 59. Wang, Y. and Y. Sun, *Insulin-like growth factor receptor-1 as an anti-cancer target: blocking transformation and inducing apoptosis.* Curr Cancer Drug Targets, 2002. **2**(3): p. 191-207.
 60. Van Obberghen, E., et al., *Surfing the insulin signaling web.* Eur J Clin Invest, 2001. **31**(11): p. 966-77.
 61. Lizcano, J.M. and D.R. Alessi, *The insulin signalling pathway.* Curr Biol, 2002. **12**(7): p. R236-8.
-

62. Shepherd, P.R., D.J. Withers, and K. Siddle, *Phosphoinositide 3-kinase: the key switch mechanism in insulin signalling*. Biochem J, 1998. **333** (Pt 3): p. 471-90.
 63. Cheatham, B., et al., *Phosphatidylinositol 3-kinase activation is required for insulin stimulation of pp70 S6 kinase, DNA synthesis, and glucose transporter translocation*. Mol Cell Biol, 1994. **14**(7): p. 4902-11.
 64. Vanhaesebroeck, B. and D.R. Alessi, *The PI3K-PDK1 connection: more than just a road to PKB*. Biochem J, 2000. **346** Pt 3: p. 561-76.
 65. Walker, K.S., et al., *Activation of protein kinase B beta and gamma isoforms by insulin in vivo and by 3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1 in vitro: comparison with protein kinase B alpha*. Biochem J, 1998. **331** (Pt 1): p. 299-308.
 66. Kohn, A.D., et al., *Expression of a constitutively active Akt Ser/Thr kinase in 3T3-L1 adipocytes stimulates glucose uptake and glucose transporter 4 translocation*. J Biol Chem, 1996. **271**(49): p. 31372-8.
 67. Wang, Q., et al., *Protein kinase B/Akt participates in GLUT4 translocation by insulin in L6 myoblasts*. Mol Cell Biol, 1999. **19**(6): p. 4008-18.
 68. Rommel, C., et al., *Mediation of IGF-1-induced skeletal myotube hypertrophy by PI(3)K/Akt/mTOR and PI(3)K/Akt/GSK3 pathways*. Nat Cell Biol, 2001. **3**(11): p. 1009-13.
 69. Nakae, J., et al., *The forkhead transcription factor Foxo1 (Fkhr) confers insulin sensitivity onto glucose-6-phosphatase expression*. J Clin Invest, 2001. **108**(9): p. 1359-67.
 70. Hardie, D.G. and D. Carling, *The AMP-activated protein kinase-fuel gauge of the mammalian cell?* Eur J Biochem, 1997. **246**(2): p. 259-73.
 71. Rutter, G.A., G. Da Silva Xavier, and I. Leclerc, *Roles of 5'-AMP-activated protein kinase (AMPK) in mammalian glucose homeostasis*. Biochem J, 2003. **375**(Pt 1): p. 1-16.
 72. Daval, M., F. Foufelle, and P. Ferre, *Functions of AMP-activated protein kinase in adipose tissue*. J Physiol, 2006. **574**(Pt 1): p. 55-62.
 73. Yamauchi, T., et al., *Adiponectin stimulates glucose utilization and fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase*. Nat Med, 2002. **8**(11): p. 1288-95.
 74. Minokoshi, Y., et al., *Leptin stimulates fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase*. Nature, 2002. **415**(6869): p. 339-43.
 75. Fryer, L.G., et al., *Characterization of the role of the AMP-activated protein kinase in the stimulation of glucose transport in skeletal muscle cells*. Biochem J, 2002. **363**(Pt 1): p. 167-74.
 76. Hawley, S.A., et al., *Complexes between the LKB1 tumor suppressor, STRAD alpha/beta and MO25 alpha/beta are upstream kinases in the AMP-activated protein kinase cascade*. J Biol, 2003. **2**(4): p. 28.
 77. Hawley, S.A., et al., *Calmodulin-dependent protein kinase kinase-beta is an alternative upstream kinase for AMP-activated protein kinase*. Cell Metab, 2005. **2**(1): p. 9-19.
 78. Kane, S., et al., *A method to identify serine kinase substrates. Akt phosphorylates a novel adipocyte protein with a Rab GTPase-activating protein (GAP) domain*. J Biol Chem, 2002. **277**(25): p. 22115-8.
 79. Sano, H., et al., *Insulin-stimulated phosphorylation of a Rab GTPase-activating protein regulates GLUT4 translocation*. J Biol Chem, 2003. **278**(17): p. 14599-602.
 80. Jakobsen, S.N., et al., *5'-AMP-activated protein kinase phosphorylates IRS-1 on Ser-789 in mouse C2C12 myotubes in response to 5-aminoimidazole-4-carboxamide riboside*. J Biol Chem, 2001. **276**(50): p. 46912-6.
 81. Witters, L.A., *The blooming of the French lilac*. J Clin Invest, 2001. **108**(8): p. 1105-7.
-

82. Fujii, N., N. Jessen, and L.J. Goodyear, *AMP-activated protein kinase and the regulation of glucose transport*. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2006. **291**(5): p. E867-77.
 83. Oppenheim, J., *Cytokines: Past, Present, and Future*. International Journal of Hematology, 2001. **74**(1): p. 3-8.
 84. Hu, G., et al., *Prevalence of the metabolic syndrome and its relation to all-cause and cardiovascular mortality in nondiabetic European men and women*. Arch Intern Med, 2004. **164**(10): p. 1066-76.
 85. Chan, D.C., H.P. Barrett, and G.F. Watts, *Dyslipidemia in visceral obesity: mechanisms, implications, and therapy*. Am J Cardiovasc Drugs, 2004. **4**(4): p. 227-46.
 86. Feinstein, R., et al., *Tumor necrosis factor-alpha suppresses insulin-induced tyrosine phosphorylation of insulin receptor and its substrates*. J Biol Chem, 1993. **268**(35): p. 26055-8.
 87. Skurk, T., et al., *Relationship between adipocyte size and adipokine expression and secretion*. J Clin Endocrinol Metab, 2007. **92**(3): p. 1023-33.
 88. Lehrke, M., et al., *Chemerin is associated with markers of inflammation and components of the metabolic syndrome but does not predict coronary atherosclerosis*. Eur J Endocrinol, 2009. **161**(2): p. 339-44.
 89. Weigert, J., et al., *Circulating levels of chemerin and adiponectin are higher in ulcerative colitis and chemerin is elevated in Crohn's disease*. Inflamm Bowel Dis. **16**(4): p. 630-7.
 90. Weigert, J., et al., *Systemic chemerin is related to inflammation rather than obesity in type 2 diabetes*. Clin Endocrinol (Oxf). **72**(3): p. 342-8.
 91. Nagpal, S., et al., *Tazarotene-induced gene 2 (TIG2), a novel retinoid-responsive gene in skin*. J Invest Dermatol, 1997. **109**(1): p. 91-5.
 92. Wittamer, V., et al., *Specific recruitment of antigen-presenting cells by chemerin, a novel processed ligand from human inflammatory fluids*. J Exp Med, 2003. **198**(7): p. 977-85.
 93. Bozaoglu, K., et al., *Chemerin is associated with metabolic syndrome phenotypes in a Mexican-American population*. J Clin Endocrinol Metab, 2009. **94**(8): p. 3085-8.
 94. Barnea, G., et al., *The genetic design of signaling cascades to record receptor activation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(1): p. 64-9.
 95. Cash, J.L., et al., *Synthetic chemerin-derived peptides suppress inflammation through ChemR23*. J Exp Med, 2008. **205**(4): p. 767-75.
 96. Zabel, B.A., et al., *Mast cell-expressed orphan receptor CCRL2 binds chemerin and is required for optimal induction of IgE-mediated passive cutaneous anaphylaxis*. J Exp Med, 2008. **205**(10): p. 2207-20.
 97. Bozaoglu, K., et al., *Chemerin is a novel adipokine associated with obesity and metabolic syndrome*. Endocrinology, 2007. **148**(10): p. 4687-94.
 98. Goralski, K.B., et al., *Chemerin, a novel adipokine that regulates adipogenesis and adipocyte metabolism*. J Biol Chem, 2007. **282**(38): p. 28175-88.
 99. Vermi, W., et al., *Role of ChemR23 in directing the migration of myeloid and plasmacytoid dendritic cells to lymphoid organs and inflamed skin*. J Exp Med, 2005. **201**(4): p. 509-15.
 100. Wittamer, V., et al., *Neutrophil-mediated maturation of chemerin: a link between innate and adaptive immunity*. J Immunol, 2005. **175**(1): p. 487-93.
 101. Zabel, B.A., A.M. Silverio, and E.C. Butcher, *Chemokine-like receptor 1 expression and chemerin-directed chemotaxis distinguish plasmacytoid from myeloid dendritic cells in human blood*. J Immunol, 2005. **174**(1): p. 244-51.
-

102. Meder, W., et al., *Characterization of human circulating TIG2 as a ligand for the orphan receptor ChemR23*. FEBS Lett, 2003. **555**(3): p. 495-9.
 103. Zabel, B.A., et al., *Chemerin activation by serine proteases of the coagulation, fibrinolytic, and inflammatory cascades*. J Biol Chem, 2005. **280**(41): p. 34661-6.
 104. Du, X.Y., et al., *Regulation of chemerin bioactivity by plasma carboxypeptidase N, carboxypeptidase B (activated thrombin-activable fibrinolysis inhibitor), and platelets*. J Biol Chem, 2009. **284**(2): p. 751-8.
 105. Wittamer, V., et al., *The C-terminal nonapeptide of mature chemerin activates the chemerin receptor with low nanomolar potency*. J Biol Chem, 2004. **279**(11): p. 9956-62.
 106. Guillabert, A., et al., *Role of neutrophil proteinase 3 and mast cell chymase in chemerin proteolytic regulation*. J Leukoc Biol, 2008. **84**(6): p. 1530-8.
 107. John, H., et al., *Quantification of angiotensin-converting-enzyme-mediated degradation of human chemerin 145-154 in plasma by matrix-assisted laser desorption/ionization-time-of-flight mass spectrometry*. Anal Biochem, 2007. **362**(1): p. 117-25.
 108. Cash, J.L., A.R. Christian, and D.R. Greaves, *Chemerin peptides promote phagocytosis in a ChemR23- and Syk-dependent manner*. J Immunol. **184**(9): p. 5315-24.
 109. Shimamura, K., et al., *Identification of a stable chemerin analog with potent activity toward ChemR23*. Peptides, 2009. **30**(8): p. 1529-38.
 110. Ernst, M.C. and C.J. Sinal, *Chemerin: at the crossroads of inflammation and obesity*. Trends Endocrinol Metab.
 111. Bos, J.D., et al., *Psoriasis: dysregulation of innate immunity*. Br J Dermatol, 2005. **152**(6): p. 1098-107.
 112. Nickoloff, B.J., *Skin innate immune system in psoriasis: friend or foe?* J Clin Invest, 1999. **104**(9): p. 1161-4.
 113. Ottaviani, C., et al., *CD56brightCD16(-) NK cells accumulate in psoriatic skin in response to CXCL10 and CCL5 and exacerbate skin inflammation*. Eur J Immunol, 2006. **36**(1): p. 118-28.
 114. Gerosa, F., et al., *The reciprocal interaction of NK cells with plasmacytoid or myeloid dendritic cells profoundly affects innate resistance functions*. J Immunol, 2005. **174**(2): p. 727-34.
 115. Moretta, A., et al., *NK cells at the interface between innate and adaptive immunity*. Cell Death Differ, 2008. **15**(2): p. 226-33.
 116. Graham, K.L., et al., *Chemokine-like receptor-1 expression by central nervous system-infiltrating leukocytes and involvement in a model of autoimmune demyelinating disease*. J Immunol, 2009. **183**(10): p. 6717-23.
 117. Luangsang, S., et al., *Mouse ChemR23 is expressed in dendritic cell subsets and macrophages, and mediates an anti-inflammatory activity of chemerin in a lung disease model*. J Immunol, 2009. **183**(10): p. 6489-99.
 118. Anderson, E.K., D.A. Gutierrez, and A.H. Hasty, *Adipose tissue recruitment of leukocytes*. Curr Opin Lipidol. **21**(3): p. 172-7.
 119. Caspar-Bauguil, S., et al., *Adipose tissue lymphocytes: types and roles*. J Physiol Biochem, 2009. **65**(4): p. 423-36.
 120. Weisberg, S.P., et al., *Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue*. J Clin Invest, 2003. **112**(12): p. 1796-808.
 121. Cottam, D.R., et al., *The chronic inflammatory hypothesis for the morbidity associated with morbid obesity: implications and effects of weight loss*. Obes Surg, 2004. **14**(5): p. 589-600.
-

122. Trayhurn, P. and I.S. Wood, *Signalling role of adipose tissue: adipokines and inflammation in obesity*. Biochem Soc Trans, 2005. **33**(Pt 5): p. 1078-81.
 123. Tan, B.K., et al., *Insulin and metformin regulate circulating and adipose tissue chemerin*. Diabetes, 2009. **58**(9): p. 1971-7.
 124. Ress, C., et al., *Effect of bariatric surgery on circulating chemerin levels*. Eur J Clin Invest. **40**(3): p. 277-80.
 125. Sell, H., et al., *Chemerin correlates with markers for fatty liver in morbidly obese patients and strongly decreases after weight loss induced by bariatric surgery*. J Clin Endocrinol Metab. **95**(6): p. 2892-6.
 126. Roh, S.G., et al., *Chemerin--a new adipokine that modulates adipogenesis via its own receptor*. Biochem Biophys Res Commun, 2007. **362**(4): p. 1013-8.
 127. Muruganandan, S., A.A. Roman, and C.J. Sinal, *Role of chemerin/CMKLR1 signaling in adipogenesis and osteoblastogenesis of bone marrow stem cells*. J Bone Miner Res. **25**(2): p. 222-34.
 128. Takahashi, M., et al., *Chemerin enhances insulin signaling and potentiates insulin-stimulated glucose uptake in 3T3-L1 adipocytes*. FEBS Lett, 2008. **582**(5): p. 573-8.
 129. Ernst, M.C., et al., *Chemerin exacerbates glucose intolerance in mouse models of obesity and diabetes*. Endocrinology. **151**(5): p. 1998-2007.
 130. Parlee, S.D., et al., *Serum chemerin levels vary with time of day and are modified by obesity and tumor necrosis factor- α* . Endocrinology. **151**(6): p. 2590-602.
 131. Spiroglou, S.G., et al., *Adipokines in periaortic and epicardial adipose tissue: differential expression and relation to atherosclerosis*. J Atheroscler Thromb. **17**(2): p. 115-30.
 132. Kralisch, S., et al., *Interleukin-1 β induces the novel adipokine chemerin in adipocytes in vitro*. Regul Pept, 2009. **154**(1-3): p. 102-6.
 133. Dandona, P., et al., *Tumor necrosis factor- α in sera of obese patients: fall with weight loss*. J Clin Endocrinol Metab, 1998. **83**(8): p. 2907-10.
 134. Folsom, A.R., et al., *Impact of weight loss on plasminogen activator inhibitor (PAI-1), factor VII, and other hemostatic factors in moderately overweight adults*. Arterioscler Thromb, 1993. **13**(2): p. 162-9.
 135. Itoh, K., et al., *Relationship between changes in serum leptin levels and blood pressure after weight loss*. Hypertens Res, 2002. **25**(6): p. 881-6.
 136. James, P.T., et al., *The obesity epidemic, metabolic syndrome and future prevention strategies*. Eur J Cardiovasc Prev Rehabil, 2004. **11**(1): p. 3-8.
 137. Muoio, D.M. and C.B. Newgard, *Obesity-related derangements in metabolic regulation*. Annu Rev Biochem, 2006. **75**: p. 367-401.
 138. Sell, H., et al., *Chemerin is a novel adipocyte-derived factor inducing insulin resistance in primary human skeletal muscle cells*. Diabetes, 2009. **58**(12): p. 2731-40.
 139. Stejskal, D., et al., *Chemerin is an independent marker of the metabolic syndrome in a Caucasian population--a pilot study*. Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub, 2008. **152**(2): p. 217-21.
 140. Kukla, M., et al., *Serum chemerin and vaspin in non-alcoholic fatty liver disease*. Scand J Gastroenterol. **45**(2): p. 235-42.
 141. Muzyczka, N., *Use of adeno-associated virus as a general transduction vector for mammalian cells*. Curr Top Microbiol Immunol, 1992. **158**: p. 97-129.
 142. Kotin, R.M., et al., *Site-specific integration by adeno-associated virus*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1990. **87**(6): p. 2211-5.
-

143. Samulski, R.J., et al., *Targeted integration of adeno-associated virus (AAV) into human chromosome 19*. EMBO J, 1991. **10**(12): p. 3941-50.
 144. Siegl, G., et al., *Characteristics and taxonomy of Parvoviridae*. Intervirology, 1985. **23**(2): p. 61-73.
 145. Mori, S., et al., *Two novel adeno-associated viruses from cynomolgus monkey: pseudotyping characterization of capsid protein*. Virology, 2004. **330**(2): p. 375-83.
 146. Bueler, H., *Adeno-associated viral vectors for gene transfer and gene therapy*. Biol Chem, 1999. **380**(6): p. 613-22.
 147. Bantel-Schaal, U., et al., *Human adeno-associated virus type 5 is only distantly related to other known primate helper-dependent parvoviruses*. J Virol, 1999. **73**(2): p. 939-47.
 148. Gao, G.P., et al., *Novel adeno-associated viruses from rhesus monkeys as vectors for human gene therapy*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(18): p. 11854-9.
 149. Duan, D., et al., *Enhancement of muscle gene delivery with pseudotyped adeno-associated virus type 5 correlates with myoblast differentiation*. J Virol, 2001. **75**(16): p. 7662-71.
 150. Halbert, C.L., et al., *Repeat transduction in the mouse lung by using adeno-associated virus vectors with different serotypes*. J Virol, 2000. **74**(3): p. 1524-32.
 151. Rabinowitz, J.E. and R.J. Samulski, *Building a better vector: the manipulation of AAV virions*. Virology, 2000. **278**(2): p. 301-8.
 152. Zabner, J., et al., *Adeno-associated virus type 5 (AAV5) but not AAV2 binds to the apical surfaces of airway epithelia and facilitates gene transfer*. J Virol, 2000. **74**(8): p. 3852-8.
 153. Kaludov, N., et al., *Adeno-associated virus serotype 4 (AAV4) and AAV5 both require sialic acid binding for hemagglutination and efficient transduction but differ in sialic acid linkage specificity*. J Virol, 2001. **75**(15): p. 6884-93.
 154. Bartlett, J.S., R.J. Samulski, and T.J. McCown, *Selective and rapid uptake of adeno-associated virus type 2 in brain*. Hum Gene Ther, 1998. **9**(8): p. 1181-6.
 155. Fischer, A.C., et al., *Successful transgene expression with serial doses of aerosolized rAAV2 vectors in rhesus macaques*. Mol Ther, 2003. **8**(6): p. 918-26.
 156. Nicklin, S.A., et al., *Efficient and selective AAV2-mediated gene transfer directed to human vascular endothelial cells*. Mol Ther, 2001. **4**(3): p. 174-81.
 157. Manno, C.S., et al., *AAV-mediated factor IX gene transfer to skeletal muscle in patients with severe hemophilia B*. Blood, 2003. **101**(8): p. 2963-72.
 158. Richter, M., et al., *Adeno-associated virus vector transduction of vascular smooth muscle cells in vivo*. Physiol Genomics, 2000. **2**(3): p. 117-27.
 159. Koeberl, D.D., et al., *Persistent expression of human clotting factor IX from mouse liver after intravenous injection of adeno-associated virus vectors*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94**(4): p. 1426-31.
 160. Summerford, C. and R.J. Samulski, *Membrane-associated heparan sulfate proteoglycan is a receptor for adeno-associated virus type 2 virions*. J Virol, 1998. **72**(2): p. 1438-45.
 161. Qing, K., et al., *Human fibroblast growth factor receptor 1 is a co-receptor for infection by adeno-associated virus 2*. Nat Med, 1999. **5**(1): p. 71-7.
 162. Summerford, C., J.S. Bartlett, and R.J. Samulski, *AlphaVbeta5 integrin: a co-receptor for adeno-associated virus type 2 infection*. Nat Med, 1999. **5**(1): p. 78-82.
 163. Kessler, P.D., et al., *Gene delivery to skeletal muscle results in sustained expression and systemic delivery of a therapeutic protein*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(24): p. 14082-7.
-

164. Alexander, I.E., et al., *Potential of AAV vectors in the treatment of metabolic disease*. Gene Ther, 2008. **15**(11): p. 831-839.
 165. Cunningham, S.C., et al., *Gene delivery to the juvenile mouse liver using AAV2/8 vectors*. Mol Ther, 2008. **16**(6): p. 1081-8.
 166. Cunningham, S.C., et al., *AAV2/8-mediated correction of OTC deficiency is robust in adult but not neonatal Spf(ash) mice*. Mol Ther, 2009. **17**(8): p. 1340-6.
 167. Thomas, C.E., et al., *Rapid uncoating of vector genomes is the key to efficient liver transduction with pseudotyped adeno-associated virus vectors*. J Virol, 2004. **78**(6): p. 3110-22.
 168. Wang, Z., et al., *Adeno-associated virus serotype 8 efficiently delivers genes to muscle and heart*. Nat Biotechnol, 2005. **23**(3): p. 321-8.
 169. Wang, L., et al., *Sustained correction of bleeding disorder in hemophilia B mice by gene therapy*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(7): p. 3906-10.
 170. Bohenzky, R.A., R.B. LeFebvre, and K.I. Berns, *Sequence and symmetry requirements within the internal palindromic sequences of the adeno-associated virus terminal repeat*. Virology, 1988. **166**(2): p. 316-27.
 171. Weitzman, M.D., et al., *Adeno-associated virus (AAV) Rep proteins mediate complex formation between AAV DNA and its integration site in human DNA*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1994. **91**(13): p. 5808-12.
 172. Zhou, X. and N. Muzyczka, *In vitro packaging of adeno-associated virus DNA*. J Virol, 1998. **72**(4): p. 3241-7.
 173. Kyostio, S.R., et al., *Analysis of adeno-associated virus (AAV) wild-type and mutant Rep proteins for their abilities to negatively regulate AAV p5 and p19 mRNA levels*. J Virol, 1994. **68**(5): p. 2947-57.
 174. Beaton, A., P. Palumbo, and K.I. Berns, *Expression from the adeno-associated virus p5 and p19 promoters is negatively regulated in trans by the rep protein*. J Virol, 1989. **63**(10): p. 4450-4.
 175. Im, D.S. and N. Muzyczka, *The AAV origin binding protein Rep68 is an ATP-dependent site-specific endonuclease with DNA helicase activity*. Cell, 1990. **61**(3): p. 447-57.
 176. Owens, R.A., et al., *Identification of a DNA-binding domain in the amino terminus of adeno-associated virus Rep proteins*. J Virol, 1993. **67**(2): p. 997-1005.
 177. Samulski, R.J., *Adeno-associated virus: integration at a specific chromosomal locus*. Curr Opin Genet Dev, 1993. **3**(1): p. 74-80.
 178. Smith, R.H. and R.M. Kotin, *The Rep52 gene product of adeno-associated virus is a DNA helicase with 3'-to-5' polarity*. J Virol, 1998. **72**(6): p. 4874-81.
 179. Becerra, S.P., et al., *Synthesis of adeno-associated virus structural proteins requires both alternative mRNA splicing and alternative initiations from a single transcript*. J Virol, 1988. **62**(8): p. 2745-54.
 180. Trempe, J.P. and B.J. Carter, *Alternate mRNA splicing is required for synthesis of adeno-associated virus VP1 capsid protein*. J Virol, 1988. **62**(9): p. 3356-63.
 181. Rolling, F. and R.J. Samulski, *AAV as a viral vector for human gene therapy. Generation of recombinant virus*. Mol Biotechnol, 1995. **3**(1): p. 9-15.
 182. Matsushita, T., et al., *Adeno-associated virus vectors can be efficiently produced without helper virus*. Gene Ther, 1998. **5**(7): p. 938-45.
 183. Rohr, U.P., et al., *Primary human cells differ in their susceptibility to rAAV-2-mediated gene transfer and duration of reporter gene expression*. J Virol Methods, 2002. **105**(2): p. 265-75.
-

184. Jooss, K., et al., *Transduction of dendritic cells by DNA viral vectors directs the immune response to transgene products in muscle fibers*. J Virol, 1998. **72**(5): p. 4212-23.
 185. Surosky, R.T., et al., *Adeno-associated virus Rep proteins target DNA sequences to a unique locus in the human genome*. J Virol, 1997. **71**(10): p. 7951-9.
 186. Schnepf, B.C., et al., *Characterization of adeno-associated virus genomes isolated from human tissues*. J Virol, 2005. **79**(23): p. 14793-803.
 187. Stilwell, J.L. and R.J. Samulski, *Adeno-associated virus vectors for therapeutic gene transfer*. Biotechniques, 2003. **34**(1): p. 148-50, 152, 154 passim.
 188. Fisher, K.J., et al., *Recombinant adeno-associated virus for muscle directed gene therapy*. Nat Med, 1997. **3**(3): p. 306-12.
 189. Huang, J., et al., *Cloning of porcine chemerin, ChemR23 and GPR1 and their involvement in regulation of lipogenesis*. BMB Rep. **43**(7): p. 491-8.
 190. Gibson, U.E., C.A. Heid, and P.M. Williams, *A novel method for real time quantitative RT-PCR*. Genome Res, 1996. **6**(10): p. 995-1001.
 191. Heid, C.A., et al., *Real time quantitative PCR*. Genome Res, 1996. **6**(10): p. 986-94.
 192. Higuchi, R., et al., *Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions*. Biotechnology (N Y), 1993. **11**(9): p. 1026-30.
 193. Livak, K.J. and T.D. Schmittgen, *Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2- $[\Delta\Delta CT]$ Method*. Methods, 2001. **25**(4): p. 402-408.
 194. Kennedy, A.R., et al., *A high-fat, ketogenic diet induces a unique metabolic state in mice*. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2007. **292**(6): p. E1724-1739.
 195. Gallou-Kabani, C., et al., *C57BL/6J and A/J Mice Fed a High-Fat Diet Delineate Components of Metabolic Syndrome*. Obesity, 2007. **15**(8): p. 1996-2005.
 196. Surwit, R.S., et al., *Diet-induced type II diabetes in C57BL/6J mice*. Diabetes, 1988. **37**(9): p. 1163-1167.
 197. Winzell, M.S. and B. Ahrén, *The High-Fat Diet-Fed Mouse*. Diabetes, 2004. **53**(suppl 3): p. S215-S219.
 198. Surwit, R.S., et al., *Differential effects of fat and sucrose on the development of obesity and diabetes in C57BL/6J and A/J mice*. Metabolism, 1995. **44**(5): p. 645-651.
 199. Ishibashi, S., et al., *Hypercholesterolemia in low density lipoprotein receptor knockout mice and its reversal by adenovirus-mediated gene delivery*. J Clin Invest, 1993. **92**(2): p. 883-93.
 200. Hobbs, H.H., M.S. Brown, and J.L. Goldstein, *Molecular genetics of the LDL receptor gene in familial hypercholesterolemia*. Hum Mutat, 1992. **1**(6): p. 445-66.
 201. Zadelaar, S., et al., *Mouse models for atherosclerosis and pharmaceutical modifiers*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2007. **27**(8): p. 1706-21.
 202. Karagiannides, I., et al., *Apolipoprotein E predisposes to obesity and related metabolic dysfunctions in mice*. FEBS J, 2008. **275**(19): p. 4796-809.
 203. Schreyer, S.A., et al., *LDL receptor but not apolipoprotein E deficiency increases diet-induced obesity and diabetes in mice*. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2002. **282**(1): p. E207-214.
 204. Parolini, S., et al., *The role of chemerin in the colocalization of NK and dendritic cell subsets into inflamed tissues*. Blood, 2007. **109**(9): p. 3625-32.
 205. Zabel, B.A., et al., *Chemoattractants, extracellular proteases, and the integrated host defense response*. Exp Hematol, 2006. **34**(8): p. 1021-32.
-

-
206. Du, X.Y. and L.L. Leung, *Proteolytic regulatory mechanism of chemerin bioactivity*. Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai), 2009. **41**(12): p. 973-9.
 207. Carr, M.C. and J.D. Brunzell, *Abdominal obesity and dyslipidemia in the metabolic syndrome: importance of type 2 diabetes and familial combined hyperlipidemia in coronary artery disease risk*. J Clin Endocrinol Metab, 2004. **89**(6): p. 2601-7.
 208. Segrest, J.P., *The role of non-LDL:non-HDL particles in atherosclerosis*. Curr Diab Rep, 2002. **2**(3): p. 282-8.
 209. Selvin, E. and T.P. Erlinger, *Prevalence of and risk factors for peripheral arterial disease in the United States: results from the National Health and Nutrition Examination Survey, 1999-2000*. Circulation, 2004. **110**(6): p. 738-43.
 210. Alber, H.F., A. Suessenbacher, and F. Weidinger, *The role of inflammation in the pathophysiology of acute coronary syndromes*. Wiener Klinische Wochenschrift, 2005. **117**(13): p. 445-455.
 211. Martensson, U.E., et al., *Characterization of the human chemerin receptor--ChemR23/CMKLR1--as co-receptor for human and simian immunodeficiency virus infection, and identification of virus-binding receptor domains*. Virology, 2006. **355**(1): p. 6-17.
 212. Skrzeczynska-Moncznik, J., et al., *Chemerin and the recruitment of NK cells to diseased skin*. Acta Biochim Pol, 2009. **56**(2): p. 355-60.
 213. Skrzeczynska-Moncznik, J., et al., *Potential role of chemerin in recruitment of plasmacytoid dendritic cells to diseased skin*. Biochem Biophys Res Commun, 2009. **380**(2): p. 323-7.
 214. Albanesi, C., et al., *Chemerin expression marks early psoriatic skin lesions and correlates with plasmacytoid dendritic cell recruitment*. J Exp Med, 2009. **206**(1): p. 249-58.
-

7 Danksagung

Für meine Doktorarbeit schulde ich sehr vielen Menschen einen herzlichen Dank. Besonders möchte ich mich bei meinem Doktorvater Herrn PD Dr. med. Uli Brödl bedanken, für die Möglichkeit dieses interessante und aktuelle Thema zu bearbeiten, der mir sehr viel Geduld entgegen brachte und mit wertvollen Ratschlägen für das Gelingen der Arbeit gesorgt hat.

Mein Dank gilt Herrn PD Dr. med. Michael Lehrke, für die Unterstützung und Ratschläge und motivierenden Worte während der letzten Jahre.

Bedanken möchte ich mich auch bei Herrn Prof. Dr. Klaus Parhofer, der mir die Möglichkeit gab meine Dissertation in seiner Abteilung anzufertigen.

Sie alle gaben mir mit Ihrem fundierten Fachwissen viele Anregungen und Hilfestellungen für meine wissenschaftliche Arbeit.

Des Weiteren möchte ich mich ganz besonders bei meinen Eltern bedanken, ohne die ein Studium und eine Doktorarbeit niemals möglich gewesen wären und die mich in den vergangenen Jahren immer unterstützt und ermutigt haben, mein Leben nach meinen Vorstellungen zu gestalten.

Ein großer Dank geht aber auch an das gesamte Laborteam, denn die Zusammenarbeit mit ihnen war ein Meilenstein bei der Erstellung meiner Doktorarbeit. Ohne ihr Wissen, ohne ihre Ideen und ihre Kritik wäre mein Forschungsprojekt niemals soweit gekommen.

Liebe Inge, liebe Kerstin vielen Dank für eure Unterstützung während dieser Zeit.

Liebe Julia, vielen Dank für die vielen, langen, anstrengenden, aber doch oftmals erheiternden Stunden im Tierstall, Labor (und auch außerhalb) und für dein Engagement, mit dem du zum Gelingen meiner Arbeit sehr viel beigetragen hast.

Liebe Katja, auch dir gilt mein Dank für viele Stunden gemeinsamen Leidens und interessanter und vorantreibender Diskussionen zu unseren Versuchen, Ergebnissen und dem Laboralltag.

Abschließend möchte ich meinen Freunden danken, die mir mit ihren aufmunternden Worten durch die manchmal endlos erscheinende Zeit hindurch begleitet haben.

Liebe Doro, vielen Dank für die Korrektur meiner deutschen Grammatik, auch wenn dir bei den Inhalten kräftig der Kopf gequalmt hat.

Und einen großen Dank an Felix ohne den diese Arbeit wohl keine Kopfzeilen und Seitenzahlen hätte und deine endlose Geduld beim Korrekturlesen und Formatieren meiner Arbeit.

Vielen Dank

8 Lebenslauf

Dipl. Biologin Melanie Becker

geboren am: 11. August 1981

in: Heidelberg

Schule und Studium

November 2007- Februar 2011: Promotion in der Medizinischen Klinik 2 des Klinikums der Universität München Klinikum Großhadern im Bereich Humanbiologie, Thema: Effekte der Expression von Chemerin auf Glukose- und Lipidstoffwechsel *in vivo*

April 2007-Oktober 2007 Beginn der Promotion in der Medizinischen Klinik 3 des Klinikums der Universität München Klinikum Großhadern im Bereich Humanbiologie, Thema: Resistenzmechanismen gegen molekulare Therapieprinzipien in der akuten myeloischen Leukämie (AML)

WS 2001/02-WS 2006/07 Studium der Biologie an der Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg, Medizinische Klinik IV.
Erfolgreich abgeschlossen im Januar 2007 mit der Diplomarbeit im Fach Zellbiologie, Thema: Sortierung und subzelluläre Lokalisation der *Fatty acid transport proteins* (FATP) und *Acyl CoA synthetases* (ACSL)

2001 Abitur, Dietrich-Bonhoeffer-Gymnasium, Weinheim

Praktika und Nebenjobs

30.05.05-08.07.05 Laborpraktikum DKFZ, Heidelberg, Thema: Genexpression und Zellzyklusregulation in Säugerzellen

08.03.04-26.03.04 Laborpraktikum Universitätsklinikum Heidelberg, Thema: Hemmung des MRP2-Transporters durch Gestagene.

Mitautorenschaft bei der Publikation der Daten.

August 2004/April 2006

Tätigkeit als studentische Hilfskraft Probenanlage, Labor
Limbach, Heidelberg; Abteilung Mikrobiologie

Publikationen und Poster

1. **Melanie Becker**, Katja Rabe, Corinna Lebherz, Julia Zugwurst, Burkhard Göke, Klaus G. Parhofer, Michael Lehrke, and Uli C. Broedl; *Expression of human chemerin induces insulin resistance in the skeletal muscle but does not affect weight, lipid levels and atherosclerosis in LDL receptor knockout mice on high fat diet. Diabetes* 59:2898-2903.
2. in Arbeit; Katja Piotrowski, **Melanie Becker**, Julia Zugwurst , Ingeborg Biller-Friedman , Gerald Spöttl, Julia Möllmann, Martin Greif, Alexander W. Leber , Alexander Becker, Muhr-Tailleux A, Rüdiger Laubender, Corinna Lebherz, Bart Staels , Burkhard Göke, Nikolaus Marx, Klaus G. Parhofer, Uli C. Broedl, Michael Lehrke; *The GLP-1 metabolite GLP 9-37 increases atherosclerotic lesions in mice and is associated with coronary atherosclerosis in humans*
3. Heike Lindenmaier, **Melanie Becker**, Walter Emil Haefeli, Johanna Weiss; *Interaction of progestins with the human multidrug resistance-associated protein 2 (MRP2). Drug Metab Dispos*, 2005. **33**(11): p. 1576-9.

Posterpräsentation im September 2010 auf der Jahrestagung der European Association for the Study of Diabetes:

Expression of human chemerin induces insulin resistance in the skeletal muscle but does not affect weight, lipid levels and atherosclerosis in LDL receptor knockout mice on high fat diet

München, den 3. März 2013Melanie Becker

9 Erklärung

Hiermit erkläre ich, Melanie Becker, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema: „Rolle des Hepatoadipokins Chemerin in der Entstehung von Insulinresistenz, Dyslipidämie und Atherosklerose im Mausmodell“ selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.

München, den 3. März 2013

Melanie Becker
